

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra anorganické a organické chemie

Diplomová práce

SYNTÉZA NOVÝCH DERIVÁTŮ ISONIAZIDU
SYNTHESIS OF NOVEL ISONIAZID DERIVATIVES

Vedúci diplomovej práce: Prof. RNDr. Vinšová Jarmila, CSc.

Hradec Králové, 2013

Zuzana Rychtarčíková

Pod'akovanie

Predovšetkým sa chcem poďakovať vedúcemu diplomovej práce Prof. RNDr. Jarmile Vinšovej, CSc. za odbornú pomoc, cenné rady, pripomienky a podnety pri vypracovaní diplomovej práce. Ďalej ďakujem Prof. Dr. Slovenkovi Polancovi a celej Katedre organickej chémie, Fakulty chémie a chemickej technológie, Univerzity v Lubl'ane za odbornú pomoc pri vypracovaní experimentálnej časti diplomovej práce.

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 14.5.2013

.....

Podpis

Abstrakt

Tuberkulóza aj naďalej zostáva hlavnou príčinou úmrtnosti celosvetovej populácie. Dôraz na výskum nových antimykobakteriálne aktívnych látok sa kladie taktiež kvôli stúpajúcemu výskytu rezistencie ako v monoterapii tak aj v kombinovanej liečbe AT I. a II. radu. Jeden zo súčasných trendov vo vývoji spočíva v spájaní dvoch molekúl do jednej tzv. dvojito aktívnej zlúčeniny prostredníctvom rôznych linkerov. Pri syntéze 2-isonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov bol využitý karbonylový mostík. Syntéza týchto látok prebiehala dvomi metódami. V prvej metóde reakcia vychádzala zo substituovaného isokyanátu, v druhej metóde bola aplikovaná príprava isokyanátu *in situ* zo substituovaného anilínu použitím trifosgénu. Všetky látky boli testované pre *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu. Látka 2-izonikotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlórfenyl)hydrazínkarboxamid preukázala najvyššiu aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 s MIC hodnotou (4 µmol/L). Látky boli testované aj na ďalšie kmene mykobaktérií - *Mycobacterium avium* 330/88, *Mycobacterium kansasii* 235/80 a *Mycobacterium kansasii* 6509/96. Syntéza *N*-substituovaných fenylyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov vychádzala z vybraných pripravených 2-isonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov reakciou s trifenylyfosfínom a 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretánom. Skupina týchto látok taktiež podstúpila testovanie pre *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu.

Abstract

TB remains a major cause of population mortality in the world. Research of new substances with antimycobacterial activity is emphasized also because of increasing occurrence of resistance in case of monotherapy as well as combination therapy with AT of first and second line. Current trends in the development rest in the connection of two molecules into one – the so-called double active compound – by means of various linkers. In the process of synthesis of 2-isonicotinoyl-*N*-substituted phenylhydrazinecarboxamides, a carbonyl bridge was used. The synthesis of these substances was realized by two methods. In the first one, the reaction was based on substituted isocyanate; in the second one, preparation of isocyanate *in situ* from a substituted aniline using triphosgene was applied. All substances were tested for *in vitro* antimycobacterial activity. The substance 2-isonicotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlorophenyl)hydrazinecarboxamide exhibited the highest activity against *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 with MIC value (4 µmol/L). The compounds were also tested for other strains of mycobacteria – *Mycobacterium avium* 330/88, *Mycobacterium kansasii* 235/80 and *Mycobacterium kansasii* 6509/96. Synthesis of *N*-substituted phenyl-5-(pyridine-4-yl)-1,3,4-oxa-diazol-2-amines was based on the selected and prepared 2-isonicotinoyl-*N*-substituted phenylhydrazinecarboxamides that reacted with triphenylphosphine and 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetrachloroethane. A group of these substances also underwent testing for *in vitro* antimycobacterial activity.

Zoznam skratiek

AT	antituberkulotiká
CPX	ciprofloxacín
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetylsulfoxid- <i>d</i> ₆
EMB	etambutol
HIV	vírus nedostatku ľudskej imunity
HRMS	vysoko rozlišovacia hmotnostná spektrometria
INH	isoniazid
IR	infračervené spektrum
KatG	katalázo-preroxidázový enzým
log <i>P</i>	logaritmus rozdeľovacieho koeficientu oktan-1-ol - voda
MDD	maximálna denná dávka
MDR-TB	multirezistentný kmeň <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MS	spektrum hmotnostnej spektrometrie
MW	molekulárna hmotnosť
NFX	norfloxacín
NMR	spektrum nukleárnej magnetickej rezonancie
NÚ	nežiaduce účinky
PAS	<i>para</i> -aminosalicylová kyselina
ppm	parts per million
PZA	pyrazínamid
R.T.	izbová teplota
RIF	rifampicín
STM	streptomycín
TBC	tuberkulóza
TLC	tenkovrstvá chromatografia
TMS	trimetylsilán
<i>T</i> _t	teplota topenia
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
ZP	zdravotnícky pracovník

Obsah

Zoznam skratiek	6
Obsah.....	7
1. Úvod.....	8
1.1. Tuberkulóza.....	8
1.2. Pôvodca ochorenia	8
1.3. Tuberkulóza v číslach.....	8
1.4. Zdroj a prenos nákazy	9
1.5. Terapia.....	9
1.6. AT I. radu	10
1.7. Rezistencia	14
1.8. AT II. radu.....	15
2. Cieľ práce.....	17
3. Prehľad chemických modifikácií isoniazidu.....	18
4. Metodická časť.....	25
4.1. Príprava 2-isonikotinoyl- <i>N</i> -substituovaných fenylhydrazínkarboxamidov	25
4.2. Príprava <i>N</i> -substituovaných fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov....	27
5. Experimentálna časť	28
6. Biologická aktivita	68
7. Diskusia	72
8. Záver	75
9. Zoznam použitej literatúry	76

1. Úvod

1.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC), spôsobená patogénnymi tuberkulóznymi baktériami – mykobaktériami je infekčné ochorenie, ktoré sprevádza ľudstvo od nepamäti. Za najstarší dôkaz tejto v súčasnosti celosvetovo rozšírenej choroby sa pokladá nález patologických zmien spôsobených touto chorobou u neolitického človeka K. Pfaffom v roku 1904 pri meste Heidelberg. S dôkazmi existencie tejto choroby sa stretávame naprieč celou históriou. V staroegyptskom období, v babylonskom veku, zmienku nájdeme v Starom zákone, v období novoveku či romantizmu, až sa dostaneme do 19. storočia, kedy Robert Koch (1843 – 1910) na zasadaní Berlínskej fyziologickej spoločnosti 24. 3. 1882 prezentoval svoj objav, pôvodcu tuberkulózy, *Mycobacterium tuberculosis* (1).

1.2. Pôvodca ochorenia

Mycobacterium tuberculosis alebo tiež Kochov bacil patrí medzi acidorezistentné, nepohyblivé, nesporulujúce, striktne aeróbne paličky. Patrí do rodu *Mycobacterium*, čeľadi *Mycobacteriaceae*, radu *Actinomycetales* a kmeňa *Actinobacteria*.

Typickým znakom celej skupiny mykobaktérií je zloženie bunkovej steny. Najvýznamnejšou zloženinou sú mykolové kyseliny. Sú to nasýtené lineárne mastné kyseliny s dlhým reťazcom, ktoré sa nachádzajú pod vrstvou polypeptidov tvoriacich povrch samotného patogénu. Na mykolovú kyselinu nadväzujú peptidoglykany s fosfodiestericky viazanými molekulami *D-arabinózy* a *D-galaktózy* a pod touto vrstvou sa nachádza cytoplazmatická membrána. Takéto zloženie predurčuje vysoko hydrofóbne vlastnosti mykobaktérií, ktoré sťažujú spracovanie lysosomálnymi enzýmami makrofágov a zvyšujú náročnosť nevyhnutnej liečby.

1.3. Tuberkulóza v číslach

Tuberkulóza (TBC) stále patrí medzi hroziace globálne problémy. Spolu s maláriou a vírusom nedostatku ľudskej imunity (HIV) patrí k trom vedúcim príčinám úmrtia ľudskej populácie. Podľa výročnej správy roku 2012 Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) ochorelo v roku 2011 na TBC 8,7 milióna ľudí, podľahlo jej 1,4 milióna ľudí a 5,8 milióna novo diagnostikovaných prípadov bolo zaznamenaných do

národných kontrolných programov pre TBC. Sú to však len dve tretiny odhadovaných všetkých ochorení. U pacientov žijúcich s HIV je toto ochorenie hlavnou príčinou úmrtia a taktiež je TBC zabijakom číslo jedna v ženskej populácii (2).

Počet novo nakazených ľudí touto chorobou klesá síce pomaly, ale predsa, a to značí dosahovanie cieľu. Ten bol stanovený projektom – Rozvojové ciele tisícročia a tiež organizáciou – Partnerstvo STOP TBC, ktorá bojuje proti epidémii pomocou STOP TBC kampane. Jej základom je DOTS stratégia (priamo kontrolovaná liečba pod lekárskej dohľadom) a šesťbodová stratégia:

- zainteresovanie vlád v kontrole TBC
- pravidelná dodávka bezplatných antituberkulózných liekov
- vyhľadávanie prípadov založené na mikroskopickom vyšetrení spúta
- terapia podávaná pod priamym dohľadom zdravotníckeho pracovníka (ZP)
- tréning ZP
- audit účinnosti kontrolného programu (3; 4)

1.4. Zdroj a prenos nákazy

Zdrojom nákazy môže byť človek nakazený TBC, a to formou, ktorou vylučuje do prostredia živé baktérie (spútum, sekrét z ulcerácií, stolica, moč) alebo choré zviera v prípade, že sa človek nachádza v bezprostrednej blízkosti.

Prenos nákazy môže nastať:

- inhalačnou cestou
 - suchou cestou (inhalácia infikovaného prachu)
 - vlhkou cestou (vdychovanie kvapôčiek bronchiálneho alebo nosového sekrétu)
- priamym kontaktom u ZP, chirurgov, patológov
- konzumáciou neprevareného a nepasterizovaného mlieka či mliečnych výrobkov (5)

1.5. Terapia

TBC je celosvetovo rozšíreným infekčným ochorením, ktoré postihuje hlavne ľudí žijúcich v zlých životných podmienkach (6). Možnosť zaútočiť priamo na pôvodcu tohto ochorenia priniesla tretia etapa liečby TBC – etapa chemoterapie/etapa kauzálnej

liečby TBC, ktorá nastala v polovici 20. storočia postupnými objavmi antituberkuloticky účinných látok. Tejto etape predchádzala etapa beznádejnej liečby, ktorá zahŕňala liečbu zlúčeninami zlata, klimatoterapiu či dietetickú liečbu vykrmovaním. Na ňu nadväzovala etapa kolapsovej internej, chirurgickej a aj resekčnej liečby (7).

Význam liečby TBC v poslednej dobe narastá nie len kvôli incidencii ochorených, ale taktiež s vývojom rezistencie voči základným antituberkulotikám (AT) (6). Cieľom liečby je vyliečiť pacienta postihnutým týmto ochorením, predísť úmrtiu, zabrániť relapsom, obmedziť šírenie TBC na zdravých a zabrániť ďalšiemu vývoju získanej rezistencie na liečivá. Základ liečby tvorí podávanie AT a dodržiavanie všeobecných zásad liečby (4).

AT sú liečivá troch hlavných vlastností, ktoré sú zastúpene v rôznej miere:

- baktericidná aktivita
- schopnosť sterilizácie prostredia
- schopnosť predísť vzniku rezistencie (8)

Liečba TBC má tri charakteristiky. Je dlhodobá – za dostatočný sa považuje šesťmesačný liečebný program. Ten sa skladá z dvojmesačnej iniciálnej (uvádzacej) fázy pozostávajúcej zo štvorkombinácie AT a štvormesačnej pokračovacej (udržiavacej) fázy v dvojkombinácii AT. Z predchádzajúceho vyplýva druhá charakteristika - liečba musí byť kombinovaná, aby sa zamedzilo vzniku rezistencie. Treťou charakteristikou je neprerušenosť liečby. Za prerušenie liečby sa berie prerušenie na viac ako 2 mesiace, ktoré si vyžaduje ďalšie liečenie.

Základom liečby TBC je skupina liečiv zahŕňajúca isoniazid (INH, H), rifampicín (RIF, R), pyrazínamid (PZA, Z), streptomycín (STM, S) a etambutol (EMB, E). Skupinu týchto liečiv nazývame základné/hlavné AT alebo AT I. radu. V prípade zlyhania účinnosti týchto liečiv sa do liečebných režimov zaraďujú AT II. radu (rezervné AT).

1.6. AT I. radu

Isoniazid (I)

Hydrazid kyseliny isonikotínovej je základným a veľmi účinným AT s baktericidným účinkom proti rýchlo deliacim sa bunkám všetkých foriem TBC vnímavých voči tomuto lieku (9). Bol objavený v roku 1912 študentmi v Prahe, avšak

jeho antituberkulózná aktivita bola ohlásená až v päťdesiatych rokoch dvadsiateho storočia (10).

INH je prodrug zamerané na biosyntézu mykolovej kyseliny, ktoré ľahko prestupuje do *Mycobacterium tuberculosis*. K aktivácii INH dochádza pomocou katalázo-preroxidázového enzýmu (KatG) vo vnútri mykobakteriálnej bunky (11; 12). KatG spojí acyl kyseliny isonikotínovej s NADH a vytvorí tak kovalentne spojený komplex INH-NAD, ktorý sa pevne naviaže na enoyl-acyl prenášač proteínovej reduktázy – InhA. To vyústi do zablokovania syntézy mastných kyselín (13). Tento proces inhibuje syntézu mykolovej kyseliny, ktorá je nevyhnutnou súčasťou mykobakteriálnej bunkovej steny.

INH sa vstrebáva z tráviaceho traktu dobre a rýchlo, musí sa podávať na lačno, aby nedošlo k zníženiu absorpcii. Liečivo prestupuje do všetkých telových tekutín, účinkuje intracelulárne aj extracelulárne. 10% podanej dávky sa vylučuje v nezmenenej forme, väčší podiel sa inaktivuje acetyláciou. Rýchlosť inaktívácie je daná geneticky, populáciu tak rozdeľuje na rýchlych a pomalých acetylátorov (5; 6). Okrem baktericidných účinkov proti rýchlo deliacim sa bunkám, pôsobí INH aj bakteriostaticky na neaktívne formy *Mycobacterium tuberculosis*. Vzhľadom k vývoji rezistencie sa INH používa v kombináciách s ostatnými AT.

Doporučená denná dávka je 5mg/kg s maximálnou dennou dávkou (MDD) 300mg u dospelých. Pre deti je doporučená denná dávka 5-10mg/kg s MDD 300mg. Pri podávaní dvakrát týždenne sa zvýši denná dávka u dospelých aj detí na 15mg/kg s MDD 900mg dvakrát týždenne.

INH sa podáva v kombináciách s ostatnými základnými AT vo fixne stanovených dávkovaniach. Podávajú sa kombinácie:

- INH + RIF
- INH + EMB
- INH + RIF + PZA
- INH + RIF + PZA + EMB (8)

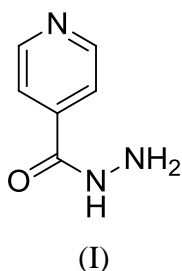
Liečebné režimy sa volia podľa diagnostikovanej TB a značia sa štandardnými kódmi. Príklad:

2(HRZE)/4(HR)₃

Liečebný režim sa skladá z úvodnej a pokračovacej fázy. Úvodná fáza trvá 2 mesiace. V zátvorke je uvedená kombinácia liekov s ich fixným dávkovaním. V tomto prípade sa jedná o denné užívanie INH, RIF, PZA a EMB. Pokračovacia fáza trvá 4

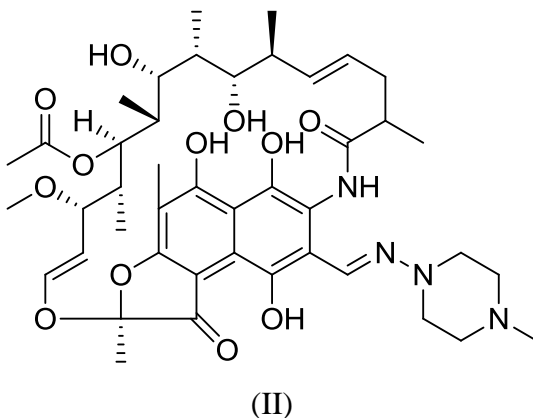
mesiace podávaním INH a RIF vo fixnom dávkovaní v dávkovacom intervale dvakrát týždenne (8).

INH je hepatotoxický a neurotoxický, pričom výskyt jeho nežiaducich účinkov (NÚ) stúpa s výškou dávky a dobou užívania. NÚ sú častejšie predovšetkým u pomalých acetylátorov. NÚ na nervový systém sa môžu prejavíť periférnou polyneuritídou, závratmi či psychickými poruchami. Abnormalita pečeneových funkcií môže byť prechodná, rovnako však môže dôjsť k ikteru, a to predovšetkým pri súbežnom podávaní rifampicínu. INH vedie k deficitu pyridoxínu a preto sa pri liečbe podáva preventívne (14).



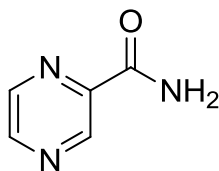
Rifampicín (II)

RIF je ansamycínové polysyntetické antibiotikum vhodné pre úvodnú aj pokračovaciu fázu. Bol objavený v roku 1966 a patrí medzi tri najdôležitejšie lieky v liečbe TBC (7). Podobne ako INH je AT s výrazným baktericídnym účinkom proti rýchlo deliacim sa bunkám (8), navyše má schopnosť sterilizácie prostredia a je schopný zničiť tzv. perzistory, baktérie, ktoré ostávajú inaktívne dlhú dobu (15). Viaže sa na DNA dependnú RNA polymerázu, čím nastáva inhibícia syntézy RNA v baktériách. Po perorálnom podaní sa vhodne absorbuje, lepšie na lačno, dobre preniká do telových tkanív a tekutín (6). Doporučuje sa obvyklá denná dávka 10mg/kg a v závislosti na telesnú hmotnosť MDD 450/600mg. Z NÚ to bývajú gastrointestinálne ťažkosti, RIF tiež spôsobuje sfarbenie slz, potu, moču a stolice do oranžovo-červenej farby.



Pyrazínamid (III)

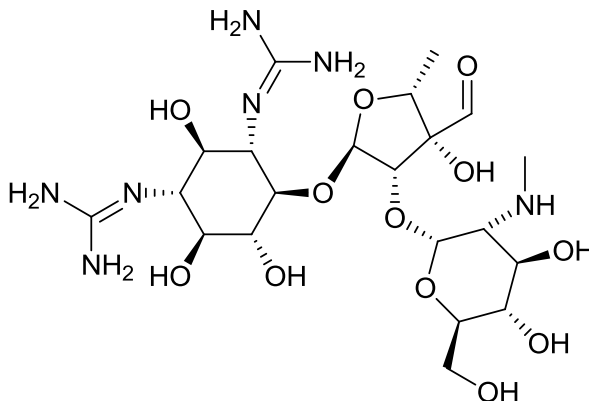
Amid kyseliny pyrazínkarboxylovej, ktorý bol objavený v roku 1952 disponuje baktericídnym účinkom a je účinný len v kyslom prostredí (7). Svoju najväčšiu aktivitu uplatňuje proti populáciám latentných a pololatených organizmov vyskytujúcich sa v makrofágu alebo kyslom prostredí (16). Mykobakteriálna pyrazínamidáza mení PZA na pyrazínovú kyselinu, čím vzniká prostredie toxické pre baktériu. Výsledkom je usmrtenie intracelulárne perzistujúcich mykobaktérií. Po perorálnom podaní sa dobre resorbuje z GIT a difunduje do tkanív a likvoru. Doporučená dávka je 20-30mg/kg s MDD 1500mg. NÚ sa prejavujú formou porúch pečenevých funkcií. PZA spôsobuje obmedzené vylučovanie kyseliny močovej, čím môže dôjsť k asymptomatickej hyperurikémii.



(III)

Streptomycín (IV)

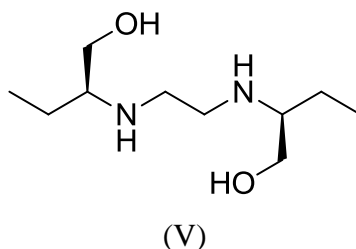
Aminoglykosidové antibiotikum zo *Streptomyces griseus* objavené v roku 1944, účinkuje baktericídne proti rýchlo množiacim sa mykobaktériám (7; 8). STM pôsobí ako inhibítor syntézy proteínov, viaže sa na 16S podjednotku bakteriálneho ribozómu, tak vzniká formyl-methionyl-tRNA naviazaná na 30S podjednotku (17) a dochádza k usmrteniu mykobaktérie. Po perorálnom podaní sa STM neresorbuje, je nutné intramuskulárne podanie. Doporučená denná dávka je 15mg/kg s MDD 750mg. Medzi NÚ patrí ototoxicita, tinnitus a vertigo. Tak ako ostatné glykosidy, tak aj STM disponuje nefrotoxickým účinkom, preto je nutné sledovanie funkcií obličiek.



(IV)

Etambutol (V)

EMB patrí medzi bakteriostatické, antimykobakteriálne látky (18), bol objavený v roku 1961. Používa sa v kombináciách s účinnými liečivami, aby sa predišlo vzniku rezistencie (8). EMB inhibuje syntézu metabolitov včlenením *D-arabinosy* do arabinogalaktanu, čím zabráni vzniku bunkovej steny. Tiež zasahuje do syntézy nukleovej kyseliny a brzdí tak rýchlo proliferujúce zárodky. Popri prevažne perorálnom podávaní je dostupná aj intravenózna aplikačná forma. Doporučuje sa denná dávka 15-25mg/kg s MDD 1000-1500mg. U 1% liečených sa vyskytuje poškodenie optického nervu (19).



TBC stále ostáva hlavnou príčinou celosvetovej úmrtnosti. Liečbu sťažuje vznik rezistencie na základné AT a preto sú liečebné režimy založené na kombináciách základných AT a AT II. radu. Otázkou ostáva, čo ďalej, pretože sa objavili kmene *Mycobacterium tuberculosis*, ktoré sú rezistentné voči všetkým v súčasnosti dostupným liekom.

1.7. Rezistencia

Rezistencia *Mycobacterium tuberculosis* ku AT sa stáva veľmi závažným problémom (20). Rezistencia choroby je definovaná ako odolnosť patogénu voči liekom užívaných pri liečbe, liečivo prestane byť miestom účinku AT. V prípade TBC je spôsobená genetickou mutáciou znásobenou predovšetkým nesprávnym konaním človeka, ako zo strany lekára, tak pacienta.

Rezistencia môže byť primárna alebo sekundárna. Primárnu rezistenciu definujeme u novozistených ochorení a ochorení liečených kratšie ako jeden mesiac. Sekundárna rezistencia sa vyskytuje u pacientov v minulosti liečených na TBC najmenej jeden mesiac.

Podľa doporučení WHO sa rezistentné kmene *Mycobacterium tuberculosis* označujú:

- monorezistentné – rezistencia na 1 zo základných AT
- polyrezistentné – rezistencia na 2 a viac základných AT
- multirezistentné – MDR-TB - rezistencia minimálne na kombináciu INH a RIF
- XDR-TB – x-liekovo rezistentná TBC, kmene rezistentné na INH a RIF a zároveň na 3 lieky zo šiestich druhov AT II. radu (5)

Najzávažnejším sa stáva TDR-TB skupina kmeňov *Mycobacterium tuberculosis*, ktorá je rezistentná na všetky AT I. a II. radu (21). V roku 2011 bol odhadovaný celkový počet MDR-TB na 310 000 u pacientov postihnutých pľúcnou formou TBC. Takmer 60% prípadov sa vyskytovalo v Indii, Číne a Rusku (2). Liečba rezistentných foriem TBC trvá 3-4krát dlhšie ako liečba bežnej TBC, je tiež finančne náročnejšia. Problém sa zhoršuje, ak je k TBC pridružený ďalší rizikový faktor ako HIV, drogová závislosť alebo iné stavy imunodeficiencie. Podľa odporúčaní WHO je nutné podávať minimálne taký počet citlivých liekov, na aký je pacient rezistentný.

1.8. AT II. radu

- etionamid, propionamid
- kanamycín, amikacín, kapreomycín
- cykloserín
- PAS
- ofloxacín, ciprofloxacín

Výsledkom vyššie uvedených údajov je nevyhnutný vývoj nových antituberkuloticky aktívnych látok. Výskum v oblasti liečby TBC sa ubera niekoľkými smermi. Keďže sú možnosti vývoja nových antimykobakteriálnych liečiv limitované nedostatkom vedomostí, neobjasnených javov pôvodcu tohto ochorenia, výskumné laboratória sa tak zameriavajú na zmapovanie genómu *Mycobacterium tuberculosis*. Zvlášť na gény zapojené do výstavby bunkovej steny. Objasnenie týchto javov nám môže priniesť perspektívnych kandidátov pre vývoj nových AT.

Ten môžeme zhrnúť do 3 bodov:

- liečivo s novým mechanizmom účinku použiteľné u rezistentných kmeňov
- liečivo silnejšie, selektívnejšie a rýchlo pôsobiace s baktericidným účinkom, ktorým by bolo možné skrátiť dĺžku liečby a znížiť dávku a počet podávaných liečiv
- liečivo s výhodnými vlastnosťami v liekových kombináciách (22)

2. Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce je syntéza 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenyldiazínkarboxamidov a následne z nich vybraných *N*-substituovaných fenyldiazín-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov ako potenciálne aktívnych antituberkulárnych látok. Práca nadväzuje na syntézy a hodnotenie biologickej aktivity predchádzajúcich výskumných prác uvedených v referencii č. (23; 24). Hlavnou úlohou je vytvoriť tzv. dvojito aktívnu molekulu, ktorá môže zastávať úlohu prodrug s predĺženým uvoľňovaním alebo tzv. mutual prodrug, ktoré má za úlohu predchádzať vedľajším účinkom spôsobených vytváraním toxických metabolitov pri liečbe AT, ako je uvedené v referencii č. (23; 25).

Spájanie (kombinovanie) INH s ďalšími aktívnymi molekulami sa využíva veľmi často. Na takéto kombinovanie slúži tzv. linker. V predošlých prácach v úlohe linkeru vystupoval metínový mostík – CH, ktorý spájal INH s druhou molekulou. Cieľom tejto práce je pripraviť látky, v ktorých ako linker vystupuje karbonylový mostík – CO spájajúci INH s rôzne substituovanými anilínmi. Substituenty sú zvolené na základe výsledkov predchádzajúcich prác s cieľom syntézy a charakteristiky vybraných látok a hodnotenia biologickej aktivity potenciálne aktívnych antituberkulárnych látok.

3. Prehľad chemických modifikácií isoniazidu

INH je kľúčovým liečivom v chemoterapii TBC (26). Kvôli rozvoju rezistencie sa kladie mnoho úsilia na výskum nových účinných látok. V súčasnosti je veľmi rozšíreným prístupom modifikácia AT I. a II. radu (20). Jednou z možností designu liečiva je spájanie dvoch účinných látok do jednej, čím vznikne prodrug (27). Kombinácia INH s inou účinnou látkou je pri prekonávaní rezistencie často používaná (28), pretože žiadne pozmenenie samotnej molekuly INH zatiaľ neprevýšilo účinnosť molekuly INH ako takej (29).

Nové deriváty obsahujúce INH, PZA a ďalšie účinné látky vznikli spojením metínovým mostíkom – CH. Tento nový typ molekuly môžeme považovať za „dvojito aktívnu“ molekulu, ktorá vystupuje v úlohe prodrug. Zlúčenina tohto typu môže zvyšovať biologickú dostupnosť, zlepšovať prechod membránou, dokáže zacieliť na aktívne miesto a predchádzať vzniku multirezistencie. Súčasti tejto molekuly môžu pôsobiť synergicky (30; 31; 32). Predpokladá sa, že metínový mostík môže byť postupne hydrolyzovaný, čím dôjde k uvoľneniu oboch molekúl (32).

Cieľom jedného z výskumov bolo zaviesť $-NR^1R^2$ skupinu AT II. radu, resp. akéhokoľvek nukleofilu schopného zlepšiť aktivitu nového produktu v porovnaní so známymi liečivami (23). Reakciu INH s dietylmetylacetátom bol pripravený hydrazón.

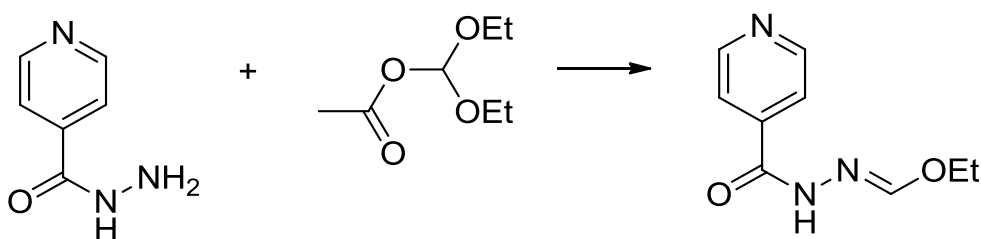


Schéma č. 1: Príprava medziproduktu pre syntézu INH derivátov

Etoxy skupina bola následne substituovaná dusíkatým nukleofilom (23).

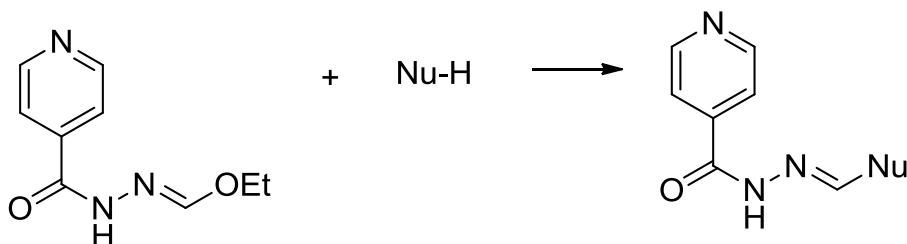
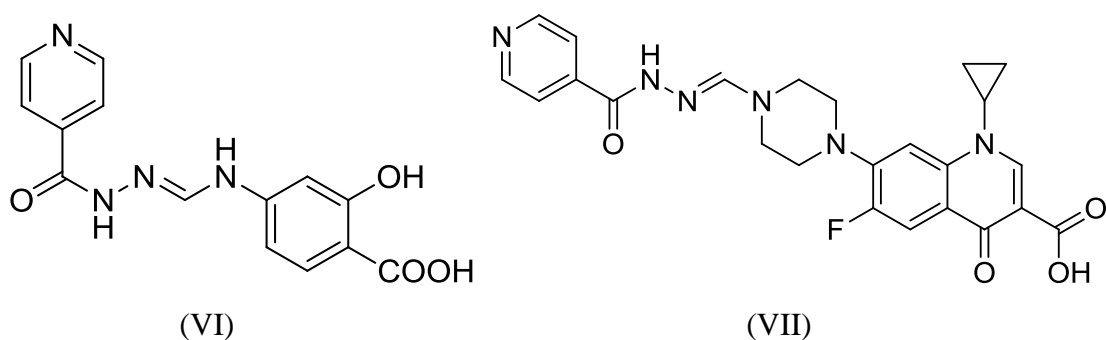


Schéma č. 2: Substitúcia hydrazónu dusíkatým nukleofilom

Bolo pripravených šesť zlúčenín, z ktorých dvom bola venovaná špeciálna pozornosť, pretože obsahovali dve tradičné liečivá – *para*-aminosalicylovú kyselinu (PAS) a ciprofloxacín (CPX) spojené CH mostíkom. 2-Hydroxy-4-[[isonikotinoylhydrazono)metyl]amino}benzoová kyselina (VI) má hodnotu minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) (0.39 µg/mL) a 1-cyklopropyl-6-fluóro-7-{4-[[isonikotinoylhydrazono)metyl]piperazin-1-yl}-4-oxo-1,4-dihydrochinolín-3-karboxylová kyselina (VII) má MIC (3.13 µg/mL) (23).



Účasť fluórochinolónov – CPX a norfloxacínu (NFX) ako druhej časti „dvojito aktívnej“ molekuly bola preukázaná ako výhodná (33). Zavedenie atómu fluóru do molekuly sa prejavilo na zlepšení antimikróbnej aktivity a lipofility (34). Hydrazid substituovanej kyseliny benzoovej reagoval s dietylmetylacetátom v prostredí acetonitrilu za vzniku etylbenzoylhydrazonoformátu, ktorý v druhom kroku reakcie reagoval s dusíkatými nukleofilmi.

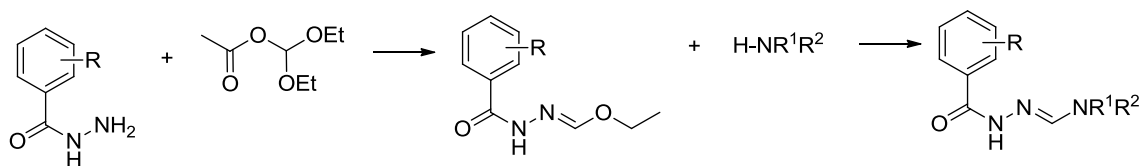
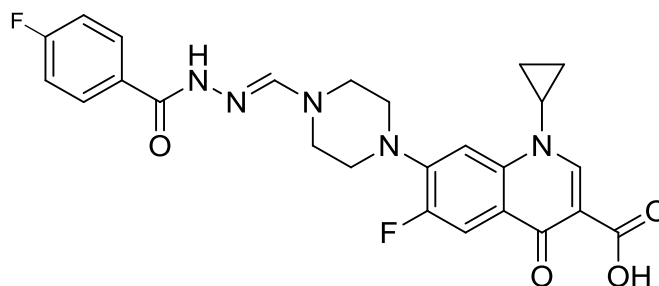


Schéma č. 3: Syntéza derivátov INH a CPX, NFX

Ako spájací reťazec tu vystupuje metínový mostík. Hydrazóny obsahujúce atóm fluóru disponujú vyššou aktivitou proti MDR-TB ako proti INH, CPX a NFX. Ich MIC hodnoty sú nižšie na MDR-TB ako na *Mycobacterium tuberculosis*. Najvyšší index selektivity pre MDR-TB dosiahla zlúčenina pozostávajúca z CPX a benzoovej kyseliny substituovanej v polohe 4 atómom fluóru – 1-cyklopropyl-6-fluór-4-oxo-7-{4-[4-

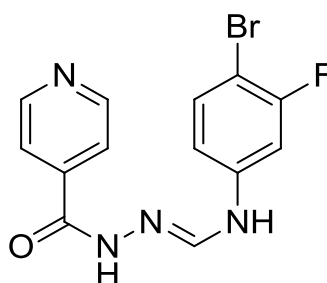
(fluórbenzoyl)hydrazónmetyl]piperazín-1-yl}-1,4-dihydrochinolín-3-karboxylová kyselina (VIII) (32).



(VIII)

Zavedenie elektrón-odčerpávajúcich substituentov do molekuly antituberkuloticky aktívnej látky vo všeobecnosti zvyšuje aktivitu a lipofilitu, ktorá je dôležitá pre transport mykobakteriálnou stenou (29). Zvýšenie antimykobakteriálnej aktivity INH bolo dosiahnuté konjugáciou s anilínom substituovaným elektrón-odčerpávajúcimi substituentmi. INH bol spojený s monosubstituovanými či disubstituovanými anilínmi cez metínový mostík za vzniku *N*-fenyl-*N'*-(pyridín-4-ylkarbonyl)hydrazonoformamidových derivátov (24). Na syntézu *N*-fenyl-*N'*-(pyridín-4-ylkarbonyl)hydrazonoformamidových derivátov boli použité dve cesty.

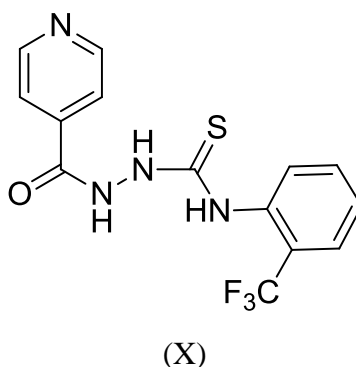
Metóda A zahŕňala reakciu INH s dietoxymetylacetátom za vzniku *N'*-isonikotinoylatoxymetylén hydrazónu, ktorý následne reagoval s vhodným derivátom anilínu. Keďže niektoré chlór, bróm a nitroderiváty nereagovali touto cestou, bol zvolený alternatívny prístup. Metódou B reagoval derivát anilínu s dietoxymetylacetátom za vzniku medziproduktu, ktorý substitúciou INH poskytol požadované zlúčeniny. Látka *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-*N'*-(pyridín-4-ylkarbonyl)hydrazónformamid (IX) preukázala najväčšiu aktivitu na všetky testované kmene a bola použitá ako vzorová zlúčenina pre ďalšie hodnotenie (24).



(IX)

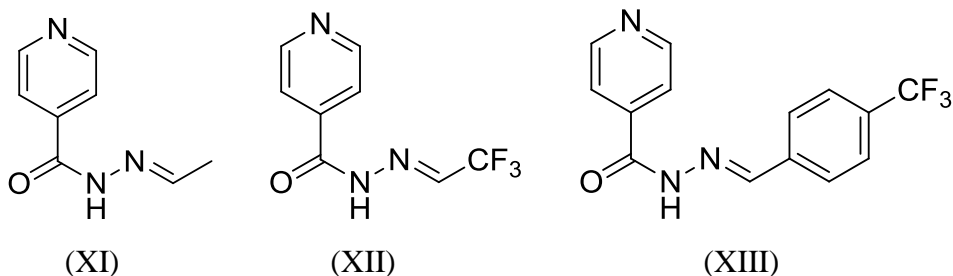
Včlenenie halogénových atómov zvýšilo lipofilitu molekuly. Na druhú stranu sa zdá byť zavedenie hydroxy alebo metoxy skupiny menej účinné, pretože podiel na lipofilite je nižší (24).

Reakciou INH s vhodnými draslíkovými soľami substituovaného fenyliokarbamátu boli pripravené rôzne isonikotinoyl hydrazínkarbotioamidy. Najúčinnjšou látkou sa stal 2-isonikotinoyl-*N*-[2-(trifluórmetyl)fenyl]hydrazínkarbotioamid (X).



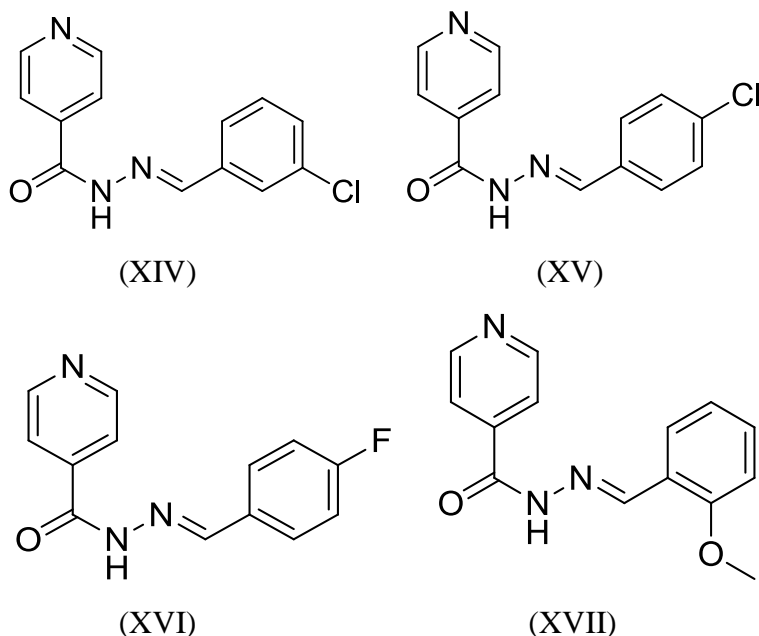
Jeho MIC hodnota bola proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a INH rezistentnému *Mycobacterium tuberculosis* (0.58 μ M) a index selektivity >218. Zvýšená lipofilita v porovnaní s INH zvyšuje schopnosť prieniku biomembránou, následkom čoho zlepšuje priestupnosť mykobakteriálnymi bunkovými membránami (35).

Bolo preukázané, že v TBC infikovanom makrofágovom modeli boli niektoré hydrazidy a INH príbuzné isonikotinoylhydrazóny viac antimykobakteriálne účinné ako INH. Zvýšená účinnosť bola pripisovaná vyššej lipofilite, ktorá bola pozorovaná u fluórfenyl a trifluórmetylphenyl substituovaných derivátov. Najvyššiu antimykobakteriálnu aktivitu preukázali látky *N'*-(1-etylidén)isonikotínhydrazid (XI), *N'*-[1-(2,2,2-trifluóretyli-dén)]isonikotínhydrazid (XII) a *N'*-[4-(trifluórmetyl)benzylidén]isonikotínhydrazid (XIII).



Najúčinnejšia zlúčenina disponovala hodnotou MIC (0.025 µg/mL) proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (28).

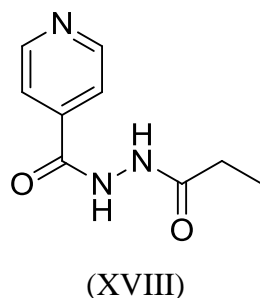
Skupina (*E*)-*N'*-(monosubstituovaný-benzylidén)izonikotínhydrazidových derivátov preukázala významnú aktivitu (0.31-0.62 µg/mL) v porovnaní s INH a RIF, čím by sa mohla stať východiskovým bodom vo vývoji nových zlúčenín určených proti multirezistentnej TBC. Zlúčeniny (*E*)-*N'*-(3-chlórbenzylidén)izonikotínhydrazid (XIV), (*E*)-*N'*-(4-chlórbenzylidén)izonikotínhydrazid (XV), (*E*)-*N'*-(4-fluórbenzylidén)izonikotínhydrazid (XVI) a (*E*)-*N'*-(2-metoxybenzylidén)izonikotínhydrazid (XVII) s hodnotou MIC (0.31 µg/mL) boli najúčinnšie.



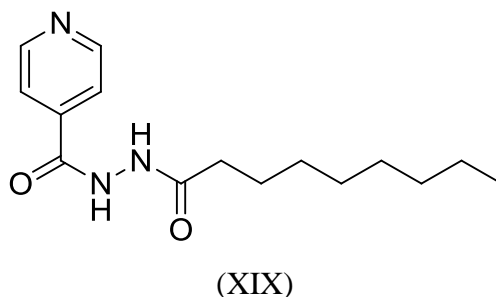
Výsledky ukázali, že by mohli byť tieto látky zamerané na rast *Mycobacterium tuberculosis* a že v rovnakej koncentrácii sú pre hostiteľské bunky netoxické. Pripravené zlúčeniny môžu byť považované za pôvodné prodrugs INH derivátov,

pretože hydrazidy po rozštípení poskytujú izonikotínovú kyselinu - bioaktívnu formu INH (36).

Acylované deriváty INH preukázali niekoľkonásobne väčšie hodnoty MIC v porovnaní s INH. Jeden z pripravených derivátov - *N'*-propionylizonikotínhydrazid (XVIII) je homologicky blízky *N*²-acetylisoniazidu, metabolitu INH, ktorý poskytuje neočakávanú ochranu TBC infikovanej myši (37).



Na pripravenom *N'*-nonanoylizonikotínhydrazide (XIX) bola meraná vnímavosť voči *Mycobacterium tuberculosis* v porovnaní s INH.



Látka ukázala nižšiu hodnotu MIC v porovnaní s INH v intervale 0.05 - 0.025 µg/mL. Výsledky ukázali citlivosť tejto látky len na bunky v začiatkovej fáze rastu, čo vedie k strate mastných kyselín a neporušenosti bunkovej morfológie väčšiny buniek (38).

Premenou INH na oxadiazoly vznikol 5-substituovaný 3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-tión a 3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-ón s ich odpovedajúcimi 3-alkyl alebo aryl derivátmi, pre ktoré je charakteristická vysoká aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (39). 1,3,4-Oxadiazoly patria do dôležitej skupiny heterocyklických zlúčenín so širokým rozsahom biologických aktivít – antivírová, antimykobakteriálna, fungicidná či antineoplastická vlastnosť (40).

Deriváty 4-(5-substituovaného-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridínu boli pripravené N-acyláciou a cyklodehydratáciou INH s acylchloridmi v prostredí dimetylformamidu (DMF).

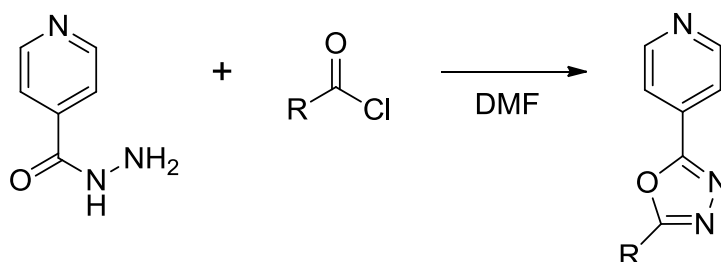
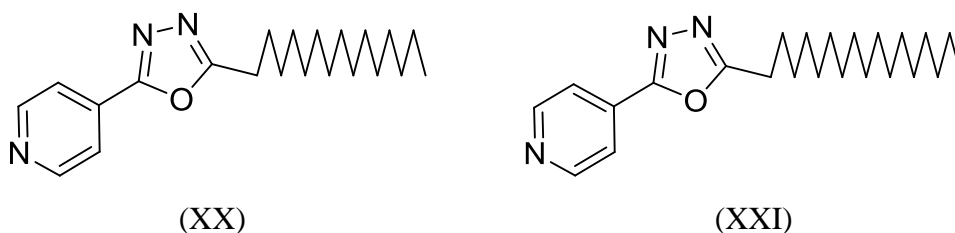


Schéma č. 4: Syntéza derivátov 4-(5-substituovaného-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridínu

Najaktívnejšími zlúčeninami pripravenými touto reakciou boli 4-(5-pentadecyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridín (XX) a 4-(5-heptadecyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridín (XXI).



Oxadiazol (XX) preukázal desaťkrát vyššiu aktivitu ako INH, dvadsaťkrát vyššiu aktivitu ako STM a dvadsaťosemkrát vyššiu účinnosť oproti EMB proti rezistentnému kmeňu CIBIN 112. Obe z týchto zlúčenín sú nositeľmi vysoko lipofilného reťazca, ktorý je naviazaný v polohe 5 oxadiazolovej jednotky. Táto skutočnosť naznačuje, že lipofilita prináša uľahčenie vstupu molekúl cez bohatú lipidovú bakteriálnu bunkovú stenu (40).

Uvedené príklady ukazujú aké možnosti chemických modifikácií molekula INH poskytuje. V nedávno vydaných publikáciách je hlásených viac ako 3000 zlúčenín založených na molekule INH (41).

4. Metodická časť

Pri príprave 2-isonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov boli použité dve metódy. Následne boli z vybraných 2-isonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov pripravené *N*-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny.

4.1. Príprava 2-isonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov

Metóda A

V tejto metóde bol ako východisková zlúčenina pre reakciu s INH použitý isokyanát dostupný z komerčného zdroja, vid' všeobecný postup A.

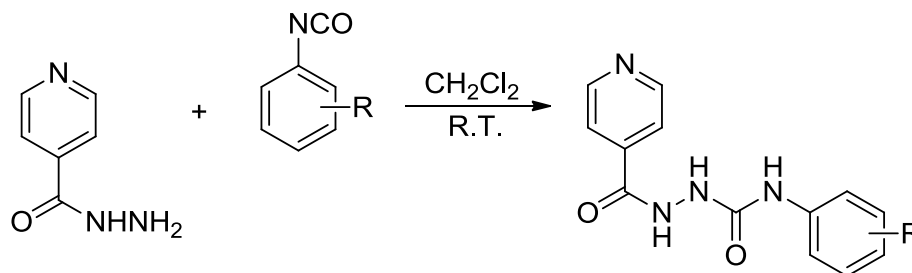


Schéma č. 5: Všeobecný postup A

K 1 mmol INH v 5 ml bezvodého dichlórmetánu bol pridaný 1 mmol príslušného isokyanátu. Reakcia prebiehala po dobu 25-30 minút za izbovej teploty. Pomocou chromatografie na tenkej vrstve bolo sledované vymiznutie východiskových látok a vznik produktu. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes odfiltrovaná a prekryštalizovaná.

Pri príprave metódou A boli použité tieto isokyanáty:

- 4-isopropylfenylisokyanát
- 4-metylfenylisokyanát
- 4-metoxifenylisokyanát

Metóda B

Druhou metódou došlo k reakcii INH s isokyanátom, ktorého príprava prebehla *in situ* z komerčne dostupného, príslušného anilínu, vid' všeobecný postup B.

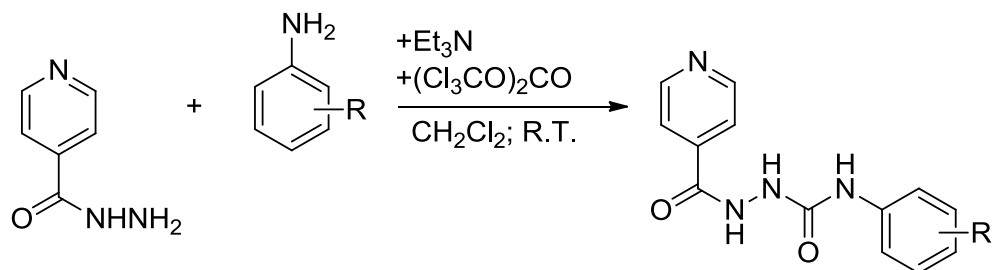


Schéma č. 6: Všeobecný postup B

K trifosgénu v bezvodom dichlórmétáne bol po kvapkách pridaný príslušný anilín suspendovaný v bezvodom dichlórmétáne. Reakcia prebiehala za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi po kvapkách pridaný trietylamín v bezvodom dichlórmétáne. Následne bol po 30 minútach pridaný INH. Pomocou chromatografie na tenkej vrstve bol sledovaný vznik produktu. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná, nasledovala extrakcia v deliacej banke a rekryštalizácia.

Pri príprave metódou B boli použité tieto anilíny:

- 3,4-dichlóranilín
- 3-chlór-4-fluóranilín
- 4-(trifluórmetyl)anilín
- 2,4,6-trichlóranilín
- 3,5-dichlóranilín
- 2,4-dibrómanilín
- 4-chlór-3-(trifluórmetyl)anilín
- 4-bróm-2-(trifluórmetyl)anilín
- 4-fluór-3-(trifluórmetyl)anilín
- 4-bróm-3-fluóranilín
- 4-bróm-2-fluóranilín
- 2-bróm-4-fluóranilín

4.2. Príprava *N*-substituovaných fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov

Z vybraných 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylhydrazínkarboxamidov boli pripravené príslušné *N*-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny, vid' všeobecný postup C.

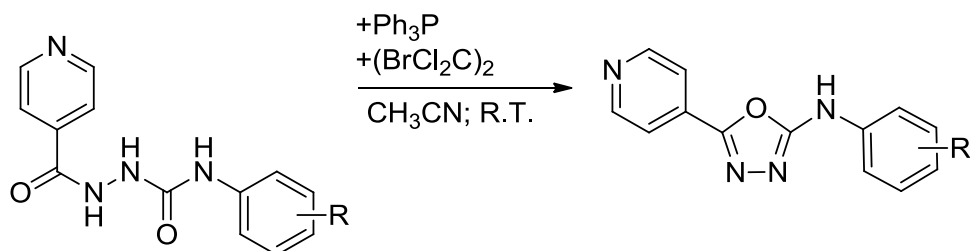


Schéma č. 7: Všeobecný postup C

K 2-izonikotinoyl-*N*-substituovanému fenylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol suspendovaný v bezvodom acetonitrile bol za stáleho miešania a izbovej teploty pridaný trifenyľfosfín a 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretán. Reakčná zmes bola následne umiestnená na ľadový kúpeľ a po kvapkách bol pridaný trietylamin. Pomocou chromatografie na tenkej vrstve bol sledovaný vznik produktu. Po 20-30 minútach bola reakčná zmes odfiltrovaná, premytá vodou, odfiltrovaná a prekryštalizovaná z metanolu.

Pri príprave boli použité tieto zlúčeniny:

- *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-2-izonikotinylhydrazínkarboxamidu
- *N*-(4-metoxifyenyl)-2-izonikotinylhydrazínkarboxamid
- *N*-(3,4-dichlórfenyl)-2-izonikotinylhydrazínkarboxamid
- *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-2-izonikotinylhydrazínkarboxamid

5. Experimentálna časť

Použité východiskové materiály pre syntézu skúmaných zlúčenín boli získané z komerčného zdroja (Aldrich).

Teploty topenia (T_f) kryštalických látok boli určené mikroskopicky Koflerovým tepelným blokom, tieto teploty neboli korigované.

Spektrá nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) boli namerané v roztoku DMSO- d_6 pri teplote 29 °C pomocou spektrometrov Bruker Avance DPX 300 (^1H NMR spektrá pri 300 MHz; ^{13}C NMR spektrá pri 75.5 MHz) a Bruker Avance III (^1H NMR spektrá pri 500 MHz; ^{13}C NMR spektrá pri 125.8 MHz). Protónové spektrá boli vzťahované na TMS ako vnútorný štandard, uhlíkové posuny boli stanovené s ohľadom na centrálnu líniu signálu rozpúšťadla (DMSO- d_6 pri $\delta = 39.5$ ppm).

Infračervené spektrá (IR) boli získané prístrojmi Bio-Rad FTS 3000MX (KBr tablety) a Perkin–Elmer Spektrum 100, vybavené Specac Golden Gate Diamond ATR ako podpora pevnej látky.

Spektrá hmotnostnej spektrometrie (MS) boli zaznamenané pomocou prístroja VG-Analytical AutoSpec Q a spektrometra Agilent 62224 Accurate Mass TOF LC/MS. Elementálna analýza (C, H, N) bola uskutočnená pomocou analyzátora Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O.

Tenkovrstvá chromatografia (TLC) bola vykonaná na Fluka silikagélových TLC-doskách a vizualizovaná pomocou CAMAG UV lampy s vlnovou dĺžkou 254 nm a 366 nm. Ako mobilné fázy boli použité 2 sústavy: petroléter-etylacetát v pomere 3:1 a petroléter-etylacetát-kyselina octová v pomere 25:25:1.

Čistota všetkých testovaných zlúčenín bola preverená pomocou metódy ^1H NMR a ^{13}C NMR spektroskopie ako aj elementálnej mikroanalýzy.

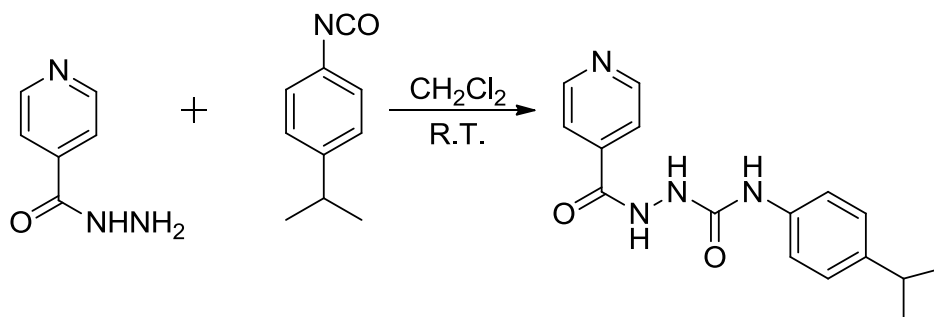
Hodnoty získané pre C, H, N analýzy boli vždy v rozmedzí $\pm 0.35\%$ z vypočítaných hodnôt.

Chemické vzorce a reakcie boli vytvorené a chemické názvy skontrolované v programoch ChemDraw Ultra 12.0 a ACD/CHemSketch.

Logaritmus rozdeľovacieho koeficientu ($\log P$) bol vypočítaný pomocou programu ChemDraw Ultra 12.0.

***N*-[4-(propan-2-yl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-34)



K 1 mmol (137,1 mg) isoniazidu, ktorý bol suspendovaný v 5 ml bezvodého dichlórmetánu, bol pridaný 1 mmol (159,4 μ l) 4-isopropylfenylisokyanátu. Reakcia prebiehala po dobu 25 minút za izbovej teploty (sledované na TLC), reakčná zmes bola následne odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 298,3 mg, t. j. 93 % *N*-[4-(propan-2-yl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

T_f = 230–233 °C (EtOAc)

Výťažok: 93 %

log *P*: 1.87

IR: 3283, 3089, 2932, 1692, 1673, 1596, 1516, 1479, 1417, 1347, 1308, 1275, 1237, 1100, 1061, 1019, 1000, 971, 923, 883, 851, 827, 788, 757, 734, 698, 625, 604 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 1.18 (6H, d, J = 7.0 Hz), 2.82 (1H, sep, J = 7.0 Hz), 7.14 (2H, d, J = 8.5), 7.38 (2H, d, J = 8.5), 7.83 a 8.78 (4H, AA'XX'), 8.26 (1H, bs), 8.82 (1H, bs), 10.59 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 24.0, 32.8, 118.8, 121.4, 126.3, 137.2, 139.6, 142.0, 150.3, 155.4, 164.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$ (298.34):

vypočítaná – 64,41% C 6,08% H 18,78% N

nameraná – 64,36% C 5,98% H 18,81% N

MS (+ESI) m/z 299 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

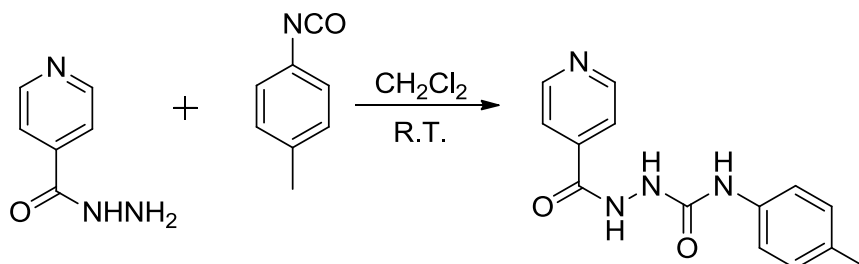
HRMS pre $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 299.1503

namerané – 299.1512

***N*-(4-metylfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-35)



K 1 mmol (137,1 mg) isoniazidu, ktorý bol suspendovaný v 5 ml bezvodého dichlórmetánu, bol pridaný 1 mmol (126 μl) 4-metylfenylisokyanátu. Reakcia prebiehala po dobu 30 minút za izbovej teploty (sledované ma TLC), reakčná zmes bola následne odfiltrovaná, premytá 3 ml dichlórmetánu a vysušená. Výťažok reakcie bol 263,1 mg, t. j. 97 % *N*-(4-metylfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 227\text{--}229\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 97 %

log *P*: 1.13

IR: 3273, 3030, 1673, 1640, 1591, 1516, 1487, 1407, 1339, 1310, 1288, 1234, 1090, 1065, 1020, 993, 918, 824, 775, 748, 683, 633 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2.23 (3H, s), 7.07 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.82 a 7.78 (4H, AA'XX'), 8.25 (1H, bs), 8.80 (1H, bs), 10.58 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 20.3, 118.7, 121.4, 129.0, 130.8, 137.0, 139.6, 150.3, 155.4, 164.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ (270.29):

vypočítaná – 62,21% C 5,22% H 20,73% N

nameraná – 61,97% C 4,95% H 20,59% N

MS (+ESI) m/z 271 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

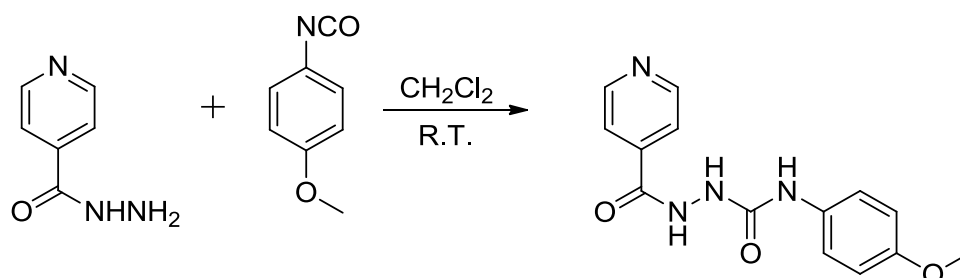
HRMS pre $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 270.1117

namerané – 270.1115

***N*-(4-metoxyfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-36)



K 1 mmol (137,1 mg) isoniazidu, ktorý bol suspendovaný v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1 mmol (129,4 μl) 4-metoxyfenylisokyanátu. Reakcia prebiehala po dobu 30 minút za izbovej teploty (sledované na TLC), reakčná zmes bola následne odfiltrovaná. Dostali sme 256,7 mg, t. j. 90 % *N*-(4-metylphenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 240\text{--}242\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výt'azok: 90 %

log *P*: 0.51

IR: 3274, 3090, 2936, 1690, 1672, 1596, 1511, 1479, 1463, 1441, 1418, 1343, 1310, 1298, 1278, 1260, 1234, 1185, 1172, 1111, 1061, 1030, 999, 967, 922, 887, 850, 830, 808, 797, 770, 749, 698, 645, 627 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.71 (3H, s), 6.85 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.36 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.82 a 8.77 (4H, AA'XX'), 8.22 (1H, bs), 8.73 (1H, bs), 10.57 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 55.1, 113.8, 120.5, 121.4, 132.5, 139.6, 150.3, 154.5, 155.6, 164.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ (286.29):

vypočítaná – 58,73% C 4,93% H 19,57% N

nameraná – 58,48% C 4,63% H 19,53% N

MS (+ESI) m/z 287 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

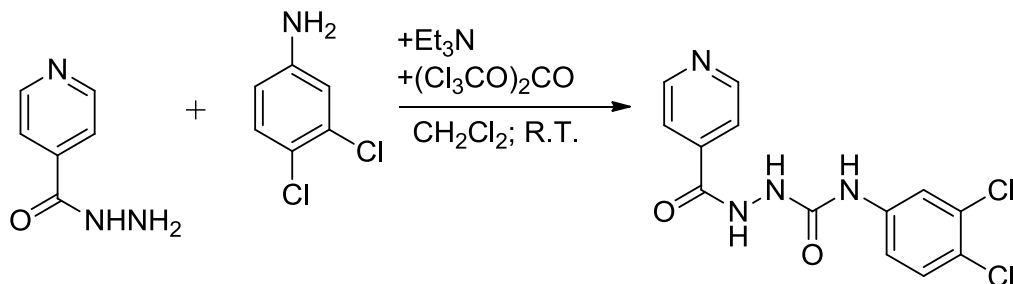
HRMS pre $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 286.1066

namerané – 286.1077

***N*-(3,4-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-38)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (163,6 mg) 3,4-dichlóranilínu, suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 μ l) trietylaminu, suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 30 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 10 ml vody, 20 ml etylacetátu a 2x 15 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 , ofiltrované a za zníženého tlaku odparené dosucha. Výťažok reakcie bol 222,7 mg, t. j. 68 % *N*-(3,4-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 220\text{--}222\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 68 %

log *P*: 1.75

IR: 3287, 3081, 2932, 1692, 1666, 1588, 1515, 1472, 1395, 1328, 1295, 1263, 1227, 1129, 1064, 1030, 1000, 904, 865, 854, 845, 810, 784, 741, 709, 690, 676, 658, 620 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.45–7.47 (1H, m), 7.52 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.82 a 8.79 (4H, AA'XX'), 7.88 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.59 (1H, bs), 9.25 (1H, bs), 10.64 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 118.7, 119.8, 121.4, 123.3, 130.5, 130.8, 139.5, 139.9, 150.4, 155.2, 164.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ (325.15):

vypočítaná – 48,02% C 3,10% H 17,23% N

nameraná – 47,75% C 2,95% H 17,05% N

MS (+ESI) m/z 325 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

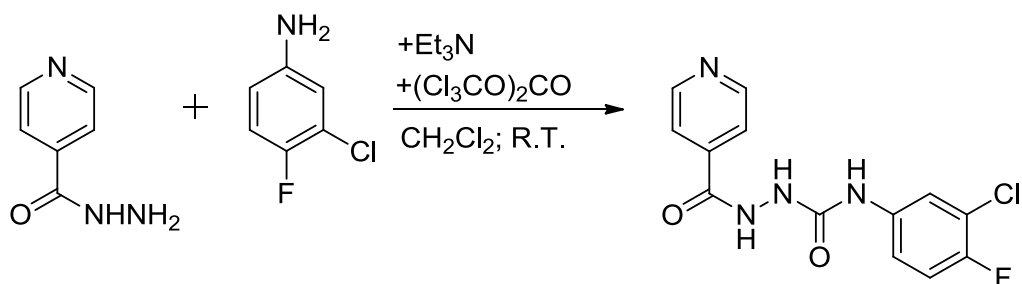
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 324.0181

namerané – 324.0179

***N*-(3-chlór-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-39)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (147 mg) 3-chlór-4-fluóranilínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 µl) trietylaminu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 10 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 10 ml vody, 20 ml etylacetátu a 2x 15 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, premyté *Brineom*, vysušené Na₂SO₄, odfiltrované a za zníženého tlaku odparené dosucha. Dostali sme 254,1 mg, t. j. 83 % *N*-(3-chlór-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

*T*_f = 212–214 °C (EtOAc)

Výt'azok: 83 %

log *P*: 1.35

IR: 3311, 3183, 3098, 2932, 1689, 1665, 1602, 1539, 1499, 1482, 1406, 1329, 1304, 1287, 1261, 1246, 1209, 1135, 1095, 1066, 1054, 1001, 931, 910, 866, 852, 819, 805, 749, 700, 679, 661, 631, 611 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.30–7.34 (1H, m), 7.39–7.41 (1H, m), 7.77–7.80 (1H, m), 7.82 a 8.78 (4H, AA'XX'), 8.52 (1H, bs), 9.12 (1H, bs), 10.61 (1H, bs).

Elementárna analýza pre C₁₃H₁₀ClFN₄O₂ (308.70):

vypočítaná –	50,58% C	3,27% H	18,15% N
nameraná –	50,48% C	3,00% H	17,98% N

MS (+ESI) m/z 309 ($[M+H]^+$)

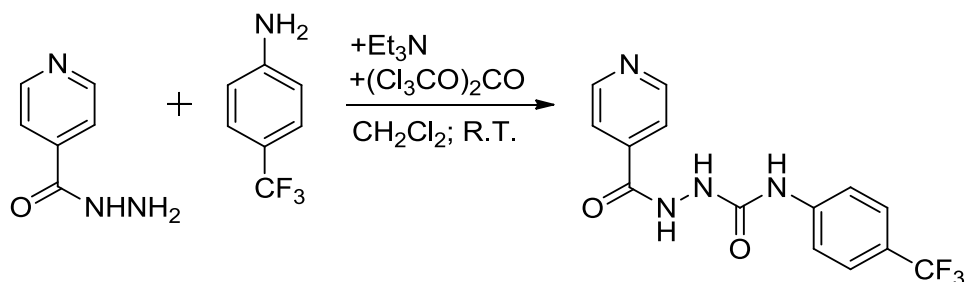
HRMS pre $C_{13}H_{11}ClFN_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 309.0549

namerané – 309.0549

2-izonikotinoyl-*N*-[4-(trifluórmetyl)fenyl]hydrazínkarboxamid

(ZR-63)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (127 μ l) 4-(trifluórmetyl)anilínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 μ l) trietylamínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 15 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 20 ml vody, 40 ml etylacetátu a 3x 30 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 , odfiltrované a za zníženého tlaku odparené dosucha. Výťažok reakcie bol 265,1 mg, t. j. 67 % 2-izonikotinoyl-*N*-[4-(trifluórmetyl)fenyl]hydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 207\text{--}210\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 67 %

$\log P$: 1.56

IR: 3115, 3029, 2170, 2113, 1755, 1731, 1674, 1634, 1610, 1554, 1498, 1451, 1428, 1335, 1267, 1221, 1110, 1083, 1066, 1015, 911, 879, 865, 840, 757, 726, 637, 613 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.62 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.70 (2H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.82 a 8.79 (4H, AA'XX'), 8.54 (1H, bs), 9.34 (1H, bs), 10.65 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 118.3 (q, $J = 2.8$ Hz), 121.4, 122.0 (q, $J = 31.7$ Hz), 124.5 (q, $J = 271.1$ Hz), 125.9 (q, $J = 3.1$ Hz), 139.5, 143.4, 150.4, 155.1, 164.9.

Elementárna analýza pre $C_{14}H_{11}F_3N_4O_2$ (324.26):

vypočítaná – 51,86% C 3,42% H 17,28% N

nameraná – 51,73% C 3,25% H 17,10% N

MS (+ESI) m/z 325 ($[M+H]^+$)

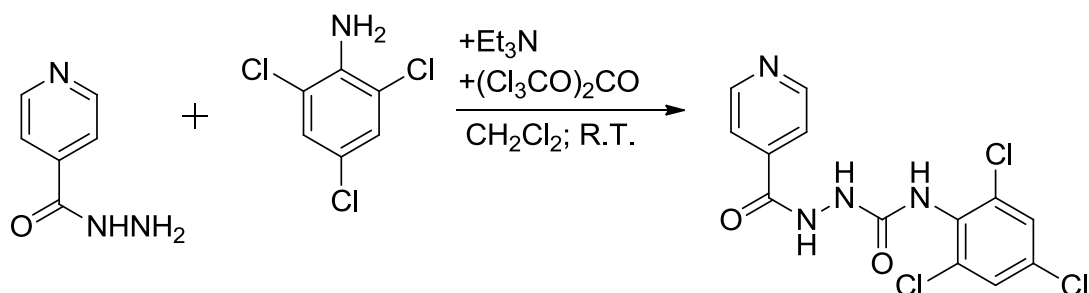
HRMS pre $C_{14}H_{12}F_3N_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 325.0907

namerané – 325.0916

2-izonikotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlórphenyl)hydrazínkarboxamid

(ZR-61)



Ku 1,6 mmol (474,8 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 20 ml bezvodého dichlórmetánu, boli pridané 4,04 mmol (793 mg) 2,4,6-trichlóranilínu, suspendovaného v 10 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli k reakčnej zmesi pridané 8,4 mmol (1170 μl) trietylamiínu, suspendovaného v 10 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli pridané 4,04 mmol (554 mg) isoniazidu. Po 60 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 30 ml vody, 70 ml etylacetátu a 2x 60 ml etylacetátu. V deliacej banke sa vytvorila suspenzia, nad ktorou bola organická fáza. Organická fáza bola oddelená, vysušená Na_2SO_4 , odfiltrovaná a za zníženého tlaku oddestilovaná. Suspenzia bola odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 1010,7 mg, t. j. 70 % 2-izonikotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlórphenyl)hydrazínkarboxamidu. Po výsledku TLC boli obe časti spojené a prekryštalizované z etylacetátu.

$T_f = 236\text{--}238\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 70 %

log *P*: 2.31

IR: 3284, 1655, 1576, 1541, 1454, 1322, 1234, 853, 828, 745, 696, 635 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.73 (2H, s), 7.95 a 8.83 (4H, AA'XX'), 8.69 (1H, bs), 8.73 (1H, bs), 10.78 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 122.3, 128.1, 131.7, 132.9, 135.2, 141.1, 148.9, 155.3, 164.3.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2$ (359.60) . $\frac{1}{10}\text{H}_2\text{O}$:

vypočítaná – 43,20% C 2,57% H 15,50% N

nameraná – 42,45% C 2,49% H 15,15% N

MS (+ESI) m/z 358 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

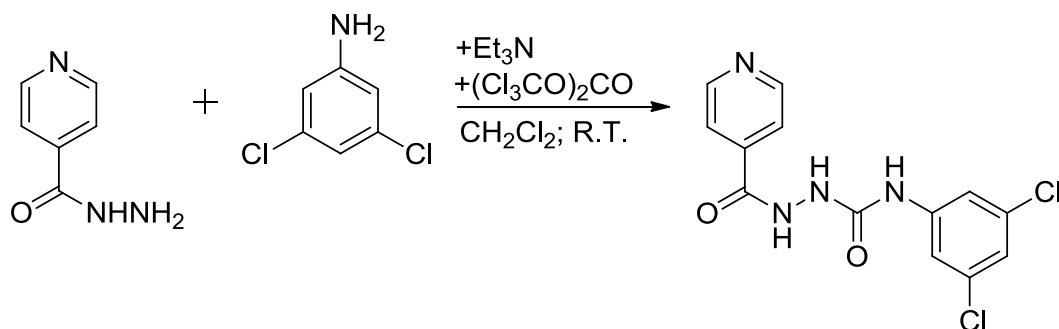
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 358.9864

namerané – 358.9869

***N*-(3,5-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-42)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (163,6 mg) 3,5-dichlóranilínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 μ l) trietylaminu, ktorý bol suspendovaný 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 15 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 20 ml vody, 40 ml etylacetátu a 2x 25 ml etylacetátu. Produkt reakcie bol nerozpustný v etylacetáte, nasledovala filtrácia. Výťažok reakcie bol 240,6 mg, t. j. 74 % *N*-(3,5-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

T_f = 226–229 °C (EtOAc)

Výt'azok: 74 %

log *P*: 1.75

IR: 3491, 3228, 1682, 1586, 1535, 1471, 1448, 1413, 1344, 1296, 1248, 1226, 1111, 1067, 1021, 996, 928, 904, 841, 833, 802, 757, 704, 667, 624 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.17 (1H, t, J = 2.0 Hz), 7.61 (2H, bs), 7.82 a 8.79 (4H, AA'XX'), 8.69 (1H, bs), 9.28 (1H, bs), 10.64 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 116.7, 121.1, 122.0, 134.0, 140.0, 142.2, 150.3, 155.1, 164.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ (325.15):

vypočítaná – 48,02% C 3,10% H 17,23% N

nameraná – 47,76% C 2,80% H 16,92% N

MS (+ESI) m/z 325 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

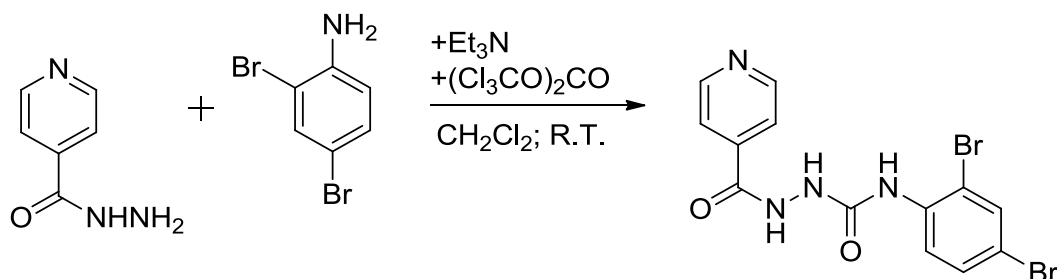
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 324.0181

namerané – 324.0182

***N*-(2,4-dibrómfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-43)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (253,0 mg) 2,4-dibrómanilínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 µl) trietylaminu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 10 ml vody, 20 ml etylacetátu a 2x 15 ml etylacetátu. Produkt reakcie bol nerozpustný v etylacetáte, nasledovala filtrácia. Výťažok reakcie bol 340,1 mg, t. j. 82 % *N*-(2,4-dibrómfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 243\text{--}244\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 82 %

log *P*: 2.3

IR: 3265, 1680, 1652, 1582, 1556, 1519, 1467, 1405, 1377, 1335, 1291, 1266, 1252, 1092, 1078, 1064, 1039, 919, 861, 834, 787, 751, 731, 683, 636 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.54 (1H, dd, $J_1 = 8.5\text{ Hz}$, $J_2 = 1.3\text{ Hz}$), 7.81 a 8.78 (4H, AA'XX'), 7.86 (1H, d, $J = 1.3\text{ Hz}$), 7.96 (1H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$), 8.32 (1H, bs), 9.14 (1H, bs), 10.75 (1H, bs).

¹³C NMR (125.8 MHz, DMSO-*d*₆): δ 114.8, 121.4, 123.3, 131.1, 134.2, 136.5, 139.3, 150.4, 154.8, 164.8.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_2$ (414.05):

vypočítaná – 37,71% C 2,43% H 13,53% N

nameraná – 37,85% C 2,30% H 13,46% N

MS (+ESI) m/z 414 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

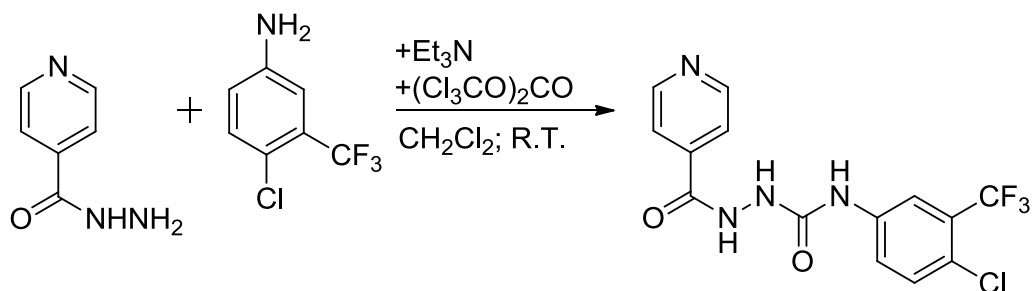
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 411.9171

namerané – 411.9183

***N*-[4-chlór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-66)



Ku 0,8 mmol (237,4 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 10 ml bezvodého dichlórmétanu, boli pridané 2,02 mmol (395,1 mg) 4-chlór-3-(trifluórmetyl)anilínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli k reakčnej zmesi pridané 4,2 mmol (585 µl) trietylamínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli pridané 2,02 mmol (277 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 25 ml vody, 50 ml etylacetátu a 2x 25 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené a za zníženého tlaku odparené dosucha. Výťažok reakcie bol 655,2 mg, t. j. 91 % *N*-[4-chlór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 231\text{--}234\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EtOAc)

Výt'azok: 91 %

log *P*: 2.12

IR: 3294, 3188, 3081, 2936, 1692, 1668, 1601, 1515, 1479, 1407, 1319, 1301, 1279, 1259, 1221, 1184, 1127, 1064, 1033, 1008, 908, 889, 877, 846, 824, 804, 736, 696, 666, 609 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.61 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.78–7.84 (3H, m), 8.09 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.70 (1H, bs), 8.78 (2H, AA'XX'), 9.40 (1H, bs), 10.66 (1H, bs).

Elementárna analýza C₁₄H₁₀ClF₃N₄O₂ (358.70):

vypočítaná –	46,88% C	2,81% H	15,62% N
nameraná –	46,72% C	2,67% H	15,35% N

MS (+ESI) m/z 359 ($[M+H]^+$)

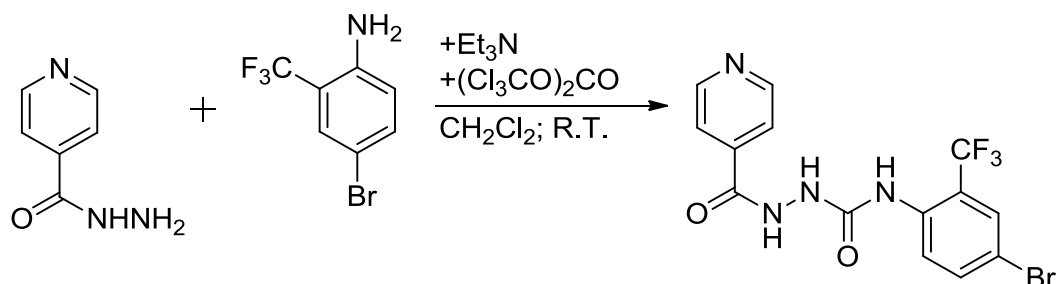
HRMS pre $C_{14}H_{11}ClF_3N_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 359.0517

namerané – 359.0521

***N*-[4-bróm-2-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-45)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (279 mg) 4-bróm-2-(trifluórmetyl)anilínu, ktorý bol suspendovaný v 7 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 µl) trietylamínu, ktorý bol suspendovaného 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 15 ml vody, 25 ml etylacetátu a 1x 20 ml etylacetátu. Produkt vypadol do organickej fázy, nasledovala filtrácia. Výtťažok bol 273,0 mg, t. j. 68 % *N*-[4-bróm-2-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazíkarboxamid, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 205\text{--}210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EtOAc)

Výtťažok: 68 %

log *P*: 2.39

IR: 3266, 1702, 1655, 1584, 1553, 1506, 1482, 1408, 1307, 1286, 1243, 1169, 1128, 1108, 1054, 998, 909, 890, 869, 842, 799, 760, 698, 681, 651 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.80–7.86 (5H, m), 8.31 (1H, bs), 8.79 (2H, AA'XX'), 9.05 (1H, bs), 10.75 (1H, bs).

Elementárna analýza pre C₁₄H₁₀BrF₃N₄O₂ (403.15) . ¼ EtOAc:

vypočítaná – 42,37% C 2,84% H 13,18% N

nameraná – 42,72% C 3,17% H 13,44% N

MS (+ESI) m/z 403 ($[M+H]^+$)

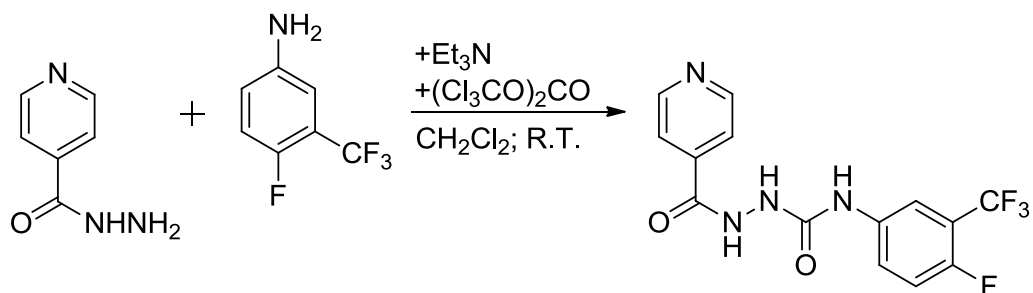
HRMS pre $C_{14}H_{11}BrF_3N_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 403.0012

namerané – 403.0018

***N*-[4-fluór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-46)



Ku 0,4 mmol (120,0 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 5 ml bezvodého dichlórmétanu, bol pridaný 1,01 mmol (129 μ l) 4-fluór-3-(trifluórmetyl)anilínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol k reakčnej zmesi pridaný 2,1 mmol (293 μ l) trietylamínu, ktorý bol suspendovaný v 3 ml bezvodého dichlórmétanu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach bol pridaný 1,01 mmol (138,5 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 10 ml vody, 20 ml etylacetátu a 2x 15 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, vysušené Na₂SO₄, odfiltrované a za zníženého tlaku oddestilované. Výťažok reakcie bol 254,0 mg, t. j. 74 % *N*-[4-fluór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

T_f = 213–215 °C (EtOAc)

Výt'azok: 74 %

log *P*: 1.72

IR: 3300, 3194, 3085, 2940, 1694, 1670, 1556, 1506, 1485, 1409, 1324, 1281, 1248, 1220, 1166, 1122, 1055, 1002, 911, 885, 850, 821, 749, 708, 653, 611 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.40–7.45 (1H, m), 7.74–7.81 (1H, m), 7.83 a 8.79 (4H, AA'XX'), 7.96–7.99 (1H, m), 8.60 (1H, s), 9.28 (1H, bs), 10.63 (1H, bs).

Elementárna analýza pre C₁₄H₁₀F₄N₄O₂ (342.25):

vypočítaná –	49,13% C	2,95% H	16,37% N
nameraná –	48,97% C	2,72% H	16,03% N

MS (+ESI) m/z 343 ($[M+H]^+$)

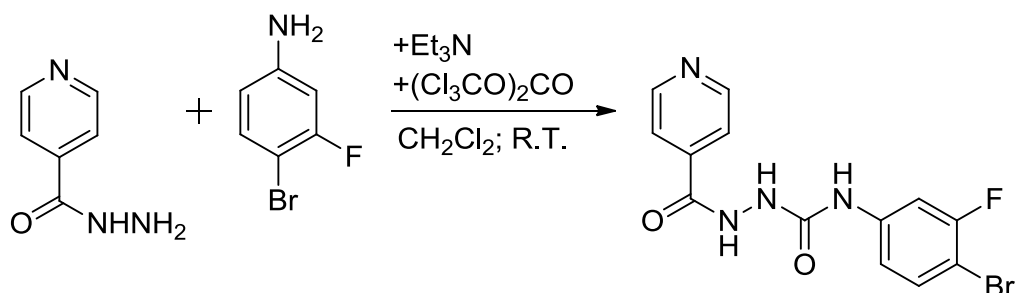
HRMS pre $C_{14}H_{11}F_4N_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 343.0813

namerané – 343.0829

***N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-51)



Ku 0,8 mmol (237,4 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 7 ml bezvodého dichlórmetánu, boli pridané 2,0 mmol (380,5 mg) 4-bróm-3-fluóranilínu, suspendovaného v 5 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli k reakčnej zmesi pridané 4,2 mmol (585 μ l) trietylaminu, suspendovaného v 5 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli pridané 2,0 mmol (274,3 mg) isoniazidu. Po 30 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 30 ml vody, 30 ml etylacetátu a 2x 20 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, vysušené Na_2SO_4 , odfiltrované a za zníženého tlaku oddestilované. Výťažok reakcie bol 628,6 mg, t. j. 89 % *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

T_f = 232–234 °C (EtOAc)

Výťažok: 89 %

log *P*: 1.63

IR: 3288, 3045, 1675, 1639, 1598, 1555, 1530, 1482, 1417, 1330, 1305, 1270, 1235, 1163, 1133, 1092, 1068, 1048, 993, 973, 912, 860, 846, 813, 772, 752, 711, 688, 650 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.22–7.25 (1H, m), 7.54–7.58 (1H, m), 7.64 (1H, dd, $J_1 = 11.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz), 7.81 a 8.78 (4H, AA'XX'), 8.57 (1H, bs), 9.28 (1H, bs), 10.63 (1H, bs).

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ (353.15):

vypočítaná – 44,21% C 2,85% H 15,87% N

nameraná – 44,10% C 2,62% H 15,64% N

MS (+ESI) m/z 353 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

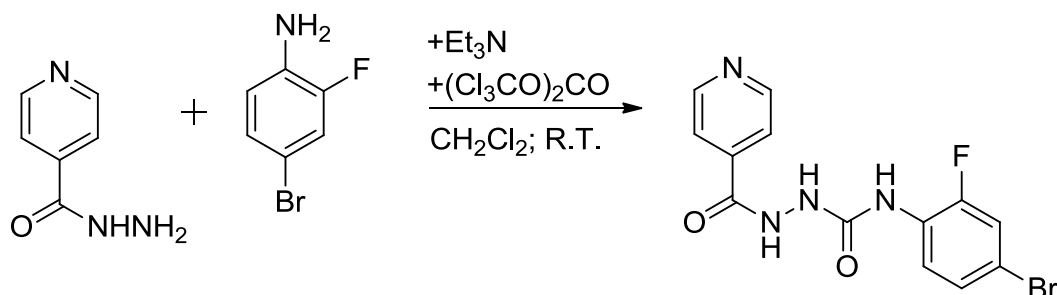
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 353.0044

namerané – 353.0033

***N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-54)



Ku 0,8 mmol (237,4 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 10 ml bezvodého dichlórmetánu, boli pridané 2,02 mmol (383,8 mg) 4-bróm-2-fluóranilínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli k reakčnej zmesi pridané 4,2 mmol (585 μ l) trietylamínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmetánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli pridané 2,02 mmol (277 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 20 ml vody, 40 ml etylacetátu a 3x 40 ml etylacetátu. V deliacej banke sa vytvorila suspenzia, nad ktorou bola organická fáza. Organická fáza bola oddelená, premytá *Brineom* a za zníženého tlaku oddestilovaná. Suspenzia bola odfiltrovaná. Produkt z organickej fázy bol čistejší a vhodnejší pre ďalšiu prácu. Výťažok reakcie bol 680,2 mg, t. j. 96 % *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

T_f = 235–238 °C (EtOAc)

Výťažok: 96 %

log *P*: 1.63

IR: 3298, 1645, 1597, 1554, 1528, 1489, 1408, 1329, 1306, 1248, 1195, 1122, 1093, 1069, 1050, 994, 891, 852, 814, 762, 751, 712, 687, 642 cm⁻¹

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.33–7.36 (1H, m), 7.55–7.59 (1H, m), 7.81 a 8.78 (4H, AA'XX'), 7.87–8.02 (1H, m), 8.65 (1H, bs), 8.86 (1H, bs), 10.72 (1H, bs).

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ (353.15):

vypočítaná – 44,21% C 2,85% H 15,87% N

nameraná – 44,09% C 2,80% H 15,71% N

MS (+ESI) m/z 353 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

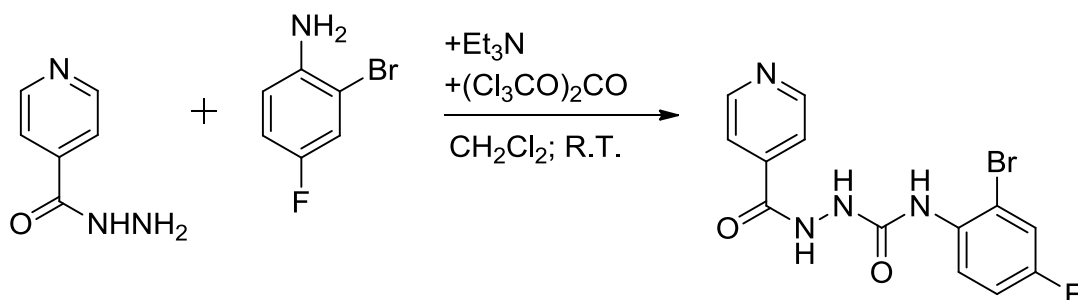
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 353.0044

namerané – 353.0062

***N*-(2-bróm-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid**

(ZR-62)



Ku 0,8 mmol (237,4 mg) trifosgénu, pod argónovou atmosférou v 10 ml bezvodého dichlórmétánu, boli pridané 2,02 mmol (230 μ l) 2-bróm-4-fluóranilínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmétánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli k reakčnej zmesi pridané 4,2 mmol (585 μ l) trietylamínu, suspendovaného v 6 ml bezvodého dichlórmétánu, po kvapkách za izbovej teploty. Po 30 minútach boli pridané 2,02 mmol (277 mg) isoniazidu. Po 20 minútach bola reakčná zmes za zníženého tlaku oddestilovaná. Nasledovala extrakcia v deliacej banke – 20 ml vody, 50 ml etylacetátu a 3x 30 ml etylacetátu. Organické fázy boli spojené, produkt začal v organickej fáze vypadávať, nasledovala filtrácia. Odfiltrovaná organická fáza bola vysušená Na_2SO_4 , odfiltrovaná a za zníženého tlaku oddestilovaná. Výťažok reakcie bol 521,5 mg, t. j. 74 % *N*-(2-bróm-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol prekryštalizovaný z etylacetátu.

$T_f = 227\text{--}229\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc)

Výťažok: 74 %

log *P*: 1.63

IR: 3262, 3019, 1670, 1649, 1599, 1554, 1484, 1405, 1389, 1339, 1255, 1189, 1098, 1065, 1032, 923, 903, 854, 845, 814, 785, 750, 672 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.22–7.27 (1H, m), 7.60–7.63 (1H, m), 7.81 a 8.78 (4H, AA'XX'), 7.87–7.90 (1H, m), 8.28 (1H, s), 8.96 (1H, bs), 10.72 (bs).

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ (353.15):

vypočítaná – 44,21% C 2,85% H 15,87% N

nameraná – 44,19% C 2,69% H 15,75% N

MS (+ESI) m/z 355 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

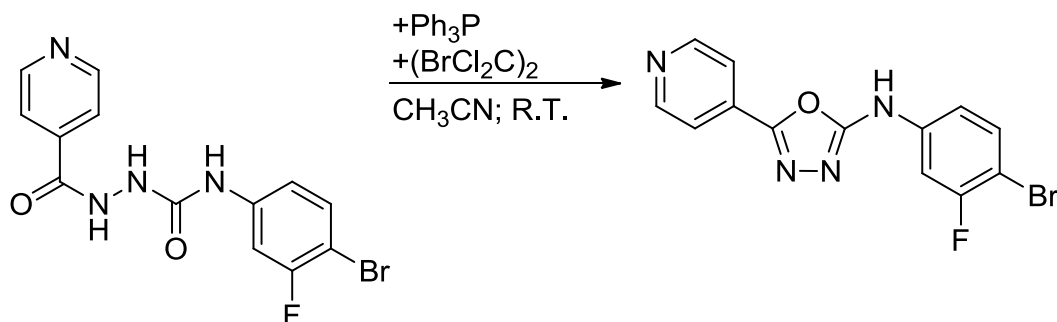
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrFN}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 353.0044

namerané – 353.0046

***N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín**

(ZR-52)



Ku 1,2 mmol (423,7 mg) *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol suspendovaný v 6 ml bezvodého acetonitrilu, boli za stáleho miešania a izbovej teploty pridané 2,4 mmol (629,5 mg) trifenyľfosfinu a 1,33 mmol (433,8 mg) 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretánu. Reakčná zmes bola následne umiestnená na ľadový kúpeľ a po kvapkách boli pridávané 5,3 mmol (733 μl) trietylaminu. Po 20 minútach bola reakčná zmes odfiltrovaná, premytá 4 ml vody a odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 312,4 mg, t. j. 77 % *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu, ktorý bol prekryštalizovaný z metanolu.

$T_f = 260\text{--}262\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH)

Výťažok: 77 %

log *P*: 3.31

IR: 1642, 1592, 1566, 1487, 1417, 1255, 1174, 1054, 1174, 1054, 1002, 822, 750, 720, 703, 682, 658 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.35–7.38 (1H, m), 7.67–7.72 (2H, m), 7.82 a 8.79 (4H, AA'XX'), 11.31 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 99.5 (d, $J = 21.1$ Hz), 105.4 (d, $J = 27.6$ Hz), 115.0 (d, $J = 3.0$ Hz), 119.3, 130.6, 133.8 (d, $J = 1.2$ Hz), 139.6 (d, $J = 10.4$ Hz), 150.9, 156.6, 158.4 (d, $J = 242.8$ Hz), 160.0.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrFN}_4\text{O}$ (335.13) . $\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$:

vypočítaná – 46,09% C 2,50% H 16,54% N

nameraná – 45,81% C 2,45% H 16,39% N

MS (+ESI) m/z 334 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

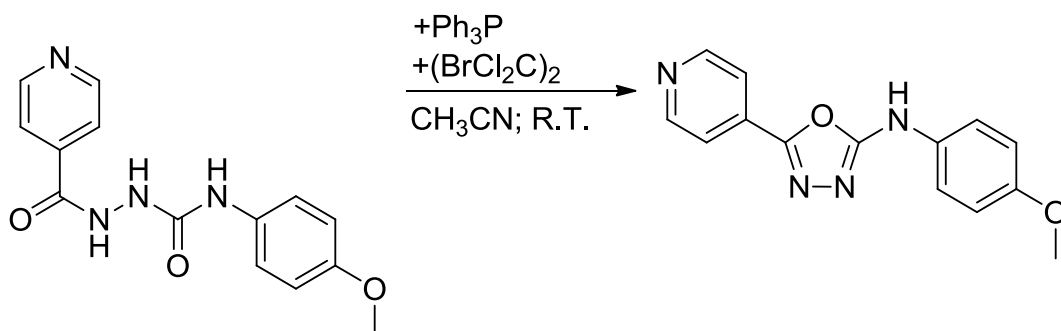
HRMS pre $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrFN}_4\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$):

vypočítané – 334.9938

namerané – 334.9937

***N*-(4-metoxyfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín**

(ZR-50)



Ku 1,0 mmol (286,3 mg) *N*-(4-metoxyfenyl)-2-izonikotinoylhydrazid, ktorý bol suspendovaný v 7 ml bezvodého acetonitrilu, boli za stáleho miešania a izbovej teploty pridané 2,0 mmol (524,8 mg) trifénylfosfínu a 1,11 mmol (360,0 mg) 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretánu. Reakčná zmes bola následne umiestnená na ľadový kúpeľ a po kvapkách boli pridávané 4,4 mmol (610 µl) trietylamínu. Po 20 minútach bola reakčná zmes odfiltrovaná, premytá 2 ml vody a odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 128,1 mg, t. j. 48 % *N*-(4-metoxyfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu, ktorý bol prekryštalizovaný z metanolu.

$T_f = 233\text{--}235\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH)

Výťažok: 48 %

log *P*: 2.2

IR: 2788, 1644, 1598, 1573, 1508, 1439, 1416, 1305, 1253, 1238, 1215, 1176, 1037, 999, 967, 872, 835, 811, 794, 761, 719, 700, 680, 628 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3.74 (3H, s), 6.97 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.54 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.79 a 8.78 (4H, AA'XX'), 10.65 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 55.2, 114.4, 118.9, 119.1, 130.8, 131.5, 150.8, 154.7, 156.0, 160.8.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ (268.27):

vypočítaná –	62,68% C	4,51% H	20,88% N
nameraná –	62,37% C	4,20% H	20,76% N

MS (+ESI) m/z 269 ($[M+H]^+$)

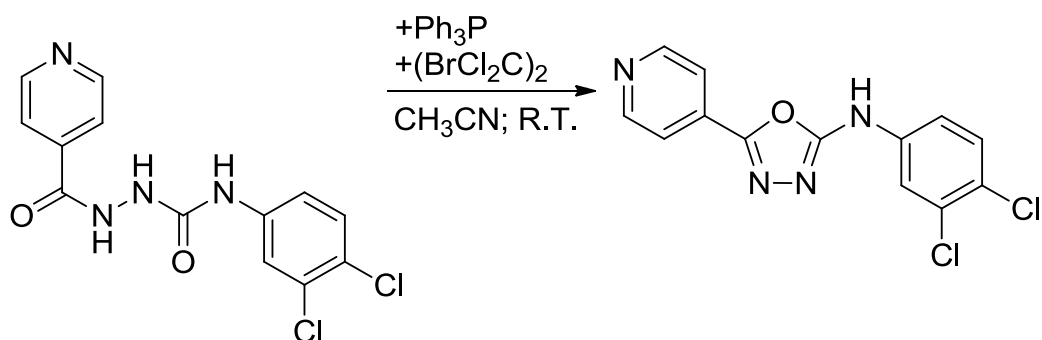
HRMS pre $C_{14}H_{13}N_4O_2$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 269.1033

namerané – 269.1033

***N*-(3,4-dichlórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín**

(ZR-57)



Ku 1,2 mmol (390,2 mg) *N*-(3,4-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamidu, ktorý bol suspendovaný v 6 ml bezvodého acetonitrilu, boli za stáleho miešania a izbovej teploty pridané 2,4 mmol (629,5 mg) trifenyľfosfinu a 1,33 mmol (433,8 mg) 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretánu. Reakčná zmes bola následne umiestnená na ľadový kúpeľ a po kvapkách boli pridávané 5,3 mmol (733 μl) trietylaminu. Po 30 minútach bola reakčná zmes odfiltrovaná, premytá 3 ml vody a odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 122,1 mg, t. j. 33 % *N*-(3,4-dichlórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu, ktorý bol prekryštalizovaný z metanolu.

$T_f = 257\text{--}259\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH)

Výťažok: 33 %

log *P*: 3.44

IR: 2766, 1635, 1589, 1567, 1475, 1404, 1302, 1249, 1129, 1051, 1001, 870, 819, 723, 703 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.54 (1H, dd, $J_1 = 8.8\text{ Hz}$, $J_2 = 2.5\text{ Hz}$), 7.62 (1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$), 7.79 a 8.79 (4H, AA'XX'), 7.93 (1H, d, $J = 2.5\text{ Hz}$), 11.26 (1H, bs).

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 117.5, 118.4, 119.3, 123.6, 130.6, 131.0, 131.4, 138.4, 150.8, 156.5, 159.9.

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}$ (307.13):

vypočítaná –	50,84% C	2,63% H	18,24% N
nameraná –	50,71% C	2,47% H	18,05% N

MS (+ESI) m/z 307 ($[M+H]^+$)

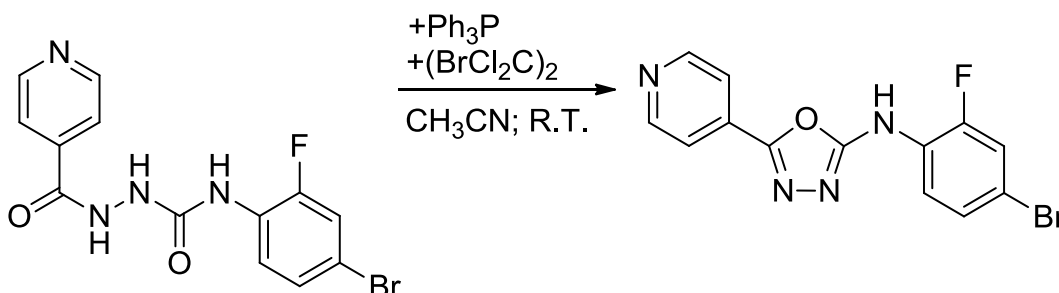
HRMS pre $C_{13}H_9Cl_2N_4O$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 307.0148

namerané – 307.015

***N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín**

(ZR-59)



Ku 1,5 mmol (529,7 mg) *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazidkarboxamidu, ktorý bol suspendovaný v 6 ml bezvodého acetonitrilu, boli za stáleho miešania a izbovej teploty pridané 3 mmol (786,8 mg) trifenyľfosfínu a 1,66 mmol (540,5 mg) 1,2-dibróm-1,1,2,2-tetrachlóretánu. Reakčná zmes bola následne umiestnená na ľadový kúpeľ a po kvapkách bolo pridávaných 6,6 mmol (916 µl) trietylamínu. Po 60 minútach bola reakčná zmes odfiltrovaná, premytá 5 ml vody a opäť odfiltrovaná. Výťažok reakcie bol 404,7 mg, t. j. 81 % *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu, ktorý bol prekryštalizovaný z metanolu.

$T_f = 260\text{--}264\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH)

Výťažok: 81 %

log *P*: 3.31

IR: 2940, 1634, 1610, 1568, 1491, 1412, 1309, 1199, 1128, 1054, 997, 886, 825, 700, 680 cm^{-1}

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.47–7.50 (1H, m), 7.63–7.67 (1H, m), 7.81 a 8.80 (4H, AA'XX'), 8.08–8.13 (1H, m), 10.89 (1H, bs)

^{13}C NMR (125.8 MHz, DMSO- d_6): δ 114.1 (d, $J = 8.6$ Hz), 118.9 (d, $J = 22.0$ Hz), 119.3, 122.0, 125.9 (d, $J = 11.2$ Hz), 127.8 (d, $J = 3.5$ Hz), 130.7, 150.8, 152.1 (d, $J = 250.5$ Hz), 156.9, 160.5 (jeden signál nie je rozpojený).

Elementárna analýza pre $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrFN}_4\text{O}$ (335.13):

vypočítaná – 46,59% C 2,41% H 16,72% N

nameraná – 46,50% C 2,29% H 16,64% N

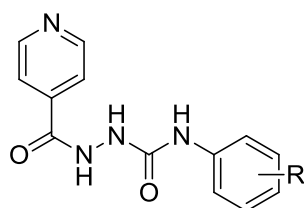
MS (+ESI) m/z 334 ($[M+H]^+$)

HRMS pre $C_{13}H_9BrFN_4O$ ($[M+H]^+$):

vypočítané – 334.9938

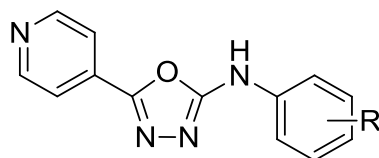
namerané – 334.9936

Tabuľka č. 1: 2-Izonikotinoyl-*N*-substituované fenyldrazínkarboxamidy



Č.	Kód	R	MW	T_f °C (EtOAc)	Výtťažok %	log <i>P</i>
1.	ZR-34	4-isopropyl	298.34	230–233	93	1.87
2.	ZR-35	4-Me	270.29	227–229	97	1.13
3.	ZR-36	4-OMe	286.29	240–242	90	0.51
4.	ZR-38	3,4-diCl	325.15	220–222	68	1.75
5.	ZR-39	3-Cl-4-F	308.70	212–214	83	1.35
6.	ZR-63	4-CF ₃	324.26	207–210	67	1.56
7.	ZR-61	2,4,6-triCl	359.60	236–238	70	2.31
8.	ZR-42	3,5-diCl	325.15	226–229	74	1.75
9.	ZR-43	2,4-diBr	414.05	243–244	82	2.3
10.	ZR-66	3-CF ₃ -4-Cl	358.70	231–234	91	2.12
11.	ZR-45	3-CF ₃ -4-Br	403.15	205–210	68	2.39
12.	ZR-46	3-CF ₃ -4-F	342.25	213–215	74	1.72
13.	ZR-51	3-F-4-Br	353.15	232–234	89	1.63
14.	ZR-54	2-F-4-Br	353.15	235–238	96	1.63
15.	ZR-62	2-Br-4-F	353.15	227–229	74	1.63

Tabuľka č. 2: *N*-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny



Č.	Kód	R	MW	T_f °C (MeOH)	Výtťažok %	log <i>P</i>
16.	ZR-52	3-F-4-Br	335.13	260–262	77	3.31
17.	ZR-50	4-OMe	268.27	233–235	48	2.2
18.	ZR-57	3,4-diCl	307.13	257–259	33	3.44
19.	ZR-59	2-F-4-Br	335.13	260–264	81	3.31

6. Biologická aktivita

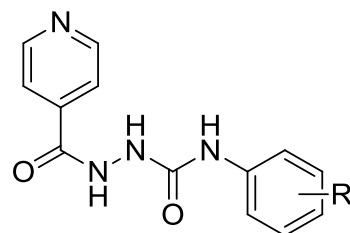
Všetky pripravené látky boli testované pre ich *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 (H37Rv) v riedení 10^{-3} a tiež proti ďalším netuberkulóznym INH-rezistentným kmeňom – *Mycobacterium avium* 330/88 (rezistentný na INH, RIF, ofloxacín a EMB) v riedení 10^{-5} a *Mycobacterium kansasii* 235/80 v riedení 10^{-4} . Jeden kmeň bol klinicky izolovaný – *Mycobacterium kansasii* 6509/96 v riedení 10^{-5} , ostatné boli získané od Českej národnej zbierky typových kultúr (CNCTC). Pre stanovenie hodnôt MIC bola použitá mikrometóda. Antimykobakteriálne aktivity boli stanovené v Šulovej pôde (SEVAC, Česká Republika) v plastických P-doštičkách. Testované látky boli na médium pridané ako roztok v DMSO. Boli použité nasledujúce koncentrácie: 1000, 500, 250, 125, 62, 32, 16, 8, 4, 2 a 1 $\mu\text{mol/L}$. MIC hodnoty boli určené po 14. a 21. dni pri inkubačnej teplote 37 °C. Pre *Mycobacterium kansasii* boli určené po 7., 14. A 21. dni pri rovnakej inkubačnej teplote.

MIC hodnota udáva najnižšiu koncentráciu, pri ktorej je pozorovaná úplná inhibícia rastu mykobaktérií. Ako referenčná látka bolo použité AT I. radu – INH.

Všetky testy boli vykonané RNDr. Jiřinou Stolaříkovou v Centre klinických laboratórií, Zdravotný ústav so sídlom v Ostrave.

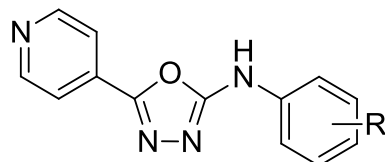
Výsledky biologického hodnotenia sú zosumarizované v tabuľke č. 3 a 4.

Tabuľka č. 3: 2-Izonikotinoyl-*N*-substituované fenyldiazínkarboxamidy



Č.	Kód	R	<i>M. tuberculosis</i> 331/88 MIC (μmol/L)		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96			log <i>P</i>
			14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
1.	ZR-34	4-isopropyl	16	32	16	32	16	16	32	8	8	16	1.87
2.	ZR-35	4-Me	62.5	62.5	16	32	62,5	125	>125	62.5	62.5	125	1.13
3.	ZR-36	4-OMe	62.5	62.5	32	62.5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	0.51
4.	ZR-38	3,4-diCl	125	125	>125	>125	125	125	125	125	125	125	1.75
5.	ZR-39	3-Cl-4-F	62.5	125	>62.5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	1.35
6.	ZR-63	4-CF ₃	62.5	62.5	>125	>125	>125	>125	>125	125	125	125	1.56
7.	ZR-61	2,4,6-triCl	4	4	>125	>125	>125	>125	>125	125	125	125	2.31
8.	ZR-42	3,5-diCl	32	62.5	125	125	125	125	125	125	125	125	1.75
9.	ZR-43	2,4-diBr	8	8	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	2.3
10.	ZR-66	3-CF ₃ -4-Cl	32	32	125	125	62,5	125	125	62.5	125	125	2.12
11.	ZR-45	3-CF ₃ -4-Br	8	8	>125	>125	>125	>125	>125	125	125	125	2.39
12.	ZR-46	3-CF ₃ -4-F	32	32	>125	>125	125	125	125	62.5	62.5	125	1.72
13.	ZR-51	3-F-4-Br	62.5	62.5	>125	>125	125	>125	>125	125	125	>125	1.63
14.	ZR-54	2-F-4-Br	32	32	>125	>125	>125	>125	>125	125	>125	>125	1.63
15.	ZR-62	2-Br-4-F	16	16	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	1.63
INH			0.5	0.5	>250	>250	>250	>250	>250	4	8	8	

Tabuľka č. 4: *N*-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny



Č.	Kód	R	<i>M. tuberculosis</i> 331/88 MIC (μmol/L)		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96			log <i>P</i>
			14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
16.	ZR-52	3-F-4-Br	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	3.31
17.	ZR-50	4-OMe	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	2.2
18.	ZR-57	3,4-diCl	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	3.44
19.	ZR-59	2-F-4-Br	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	3.31
INH			0.5	0.5	>250	>250	>250	>250	>250	4	8	8	

Najnižšia hodnota MIC proti *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 bola preukázaná u látky ZR-61 (4 $\mu\text{mol/L}$), ZR-43 (8 $\mu\text{mol/L}$) a ZR-45 (8 $\mu\text{mol/L}$) ako po 14. tak aj po 21. dni. Z Tabuľky č. 3 vyplýva, že za najaktívnejšiu molekulu zo skupiny pripravených 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylyhydrazínkarboxamidov možno považovať ZR-61, ktorá obsahuje tri atómy chlóru - 2-izonikotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlórfenyl)hydrazínkarboxamid. Biologickú aktivitu preukázala tiež substitúcia dvoch atómov brómu (2,4-diBr) a trifluórmetylovej skupiny s atómom brómu (3-CF₃-4-Br). Tieto látky disponujú najvyššími hodnotami lipofility (2.31, 2.30, 2.39).

Všetky látky boli testované aj na netuberkulózne kmene, pričom niektoré látky ukázali vyššiu biologickú aktivitu.

Proti *Mycobacterium avium* 330/88 disponovali látky ZR-34 a ZR-35 rovnakou najnižšou hodnotou MIC (16 $\mu\text{mol/L}$) po 14. dni a (32 $\mu\text{mol/L}$) po 21. Biologickú aktivitu prejavila aj látka ZR-36 s MIC hodnotou (32 $\mu\text{mol/L}$) po 7. dni.

Látky ZR-34 a ZR-35 preukázali tiež najvyššiu biologickú aktivitu proti *Mycobacterium kansasii* 235/80 a 6509/96 (kmeň získaný od pacienta z okresu Karviná). Najaktívnejšou bola pre oba kmene látka ZR-34 obsahujúca substituent isopropyl s MIC hodnotou (16 $\mu\text{mol/L}$) pre *Mycobacterium kansasii* 235/80 po 7. dni a (8 $\mu\text{mol/L}$) pre kmeň 6509/96 po 7.dni. Látka ZR-34 má pre kmeň 6509/96 biologickú aktivitu zrovnateľnú s INH.

Z Tabuľky č. 4 vyplýva, že *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 a ani ďalšie netuberkulózne kmene mykobaktérií nepreukázali žiadnu citlivosť voči celej skupine pripravených *N*-substituovaných fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov.

7. Diskusia

V tejto diplomovej práci bolo pripravených 15 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov a 4 *N*-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny. Zlúčeniny boli charakterizované pomocou teploty topenia, infračerveného spektra, ^1H a ^{13}C NMR spektra, elementálnej analýzy, spektra hmotnostnej spektrometrie a vysoko rozlišovacej hmotnostnej spektrometrie. Všetky pripravené látky neboli zatiaľ popísané v on-line databáze SciFinder ani v Reaxys. Možno ich považovať teda za pôvodné.

Oba postupy prípravy 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaný fenylylhydrazínkarboxamidov boli prevzaté z diplomovej práce uvedenej v referencii č. (42). Zmena reakčných podmienok neviedla k zvýšeniu výťažku produktu, po predĺžení reakčného času dochádzalo k vzniku vedľajších produktov. Pomocou TLC bol monitorovaný priebeh reakcie – tvorba produktu a vymiznutie reaktantov. Obomi použitými metódami boli pripravené zlúčeniny o vysokých výťažkoch, ktoré po prekryštalizovaní vhodným rozpúšťadlom viedli k čistému produktu. Reakčné podmienky oboch metód možno preto považovať za optimálne.

Postup prípravy *N*-substituovaných fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov bol podobne ako v predošlom prípade prevzatý z diplomovej práce uvedenej v referencii č. (42). Pri príprave týchto látok sa vychádzalo z pripravených 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylylhydrazínkarboxamidov. Zvolené reakčné podmienky možno taktiež považovať za najvýhodnejšie, ich zmeny neviedli k zvýšeniu výťažku ani k vyššej čistote produktu. Rekryštalizácia metanolom poskytla čistý produkt.

Prehľad pripravených zlúčenín

2-izonikotinoyl-*N*-substituované fenylylhydrazínkarboxamidy:

- *N*-[4-(propan-2-yl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(4-metylfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(4-metoxymetyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(3,4-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(3-chlór-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- 2-izonikotinoyl-*N*-[4-(trifluórmetyl)fenyl]hydrazínkarboxamid
- 2-izonikotinoyl-*N*-(2,4,6-trichlórfenyl)hydrazínkarboxamid
- *N*-(3,5-dichlórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid

- *N*-(2,4-dibrómfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-[4-chlór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-[4-bróm-2-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-[4-fluór-3-(trifluórmetyl)fenyl]-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid
- *N*-(2-bróm-4-fluórfenyl)-2-izonikotinoylhydrazínkarboxamid

N-substituované fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amíny:

- *N*-(4-bróm-3-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín
- *N*-(4-metoxyfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín
- *N*-(3,4-dichlórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín
- *N*-(4-bróm-2-fluórfenyl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín

Pripravené zlúčeniny boli testované pre ich *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* 331/88, *Mycobacterium avium* 330/88, *Mycobacterium kansasii* 235/80 a *Mycobacterium kansasii* 6509/96.

Najvyššiu aktivitu zo skupiny pripravených 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylhydrazínkarboxamidov proti *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 preukázala látka ZR-61 s MIC hodnotou (4 µmol/L) a hodnotou log *P* 2.31. Biologickú aktivitu preukázali tiež látky ZR-43 a ZR-45 s MIC (8 µmol/L) pre obe látky. Žiadna látka z tejto skupiny neprevýšila citlivosť *Mycobacterium tuberculosis* na INH. V práci uvedenej v referencii č. (24) bola pripravená skupina *N*-fenyl-*N'*-(pyridín-4-ylkarbonyl)hydrazonoformamidov, z ktorých 5 látok obsahovalo rovnako substituovaný fenyl ako 5 2-izonikotinoyl-*N*-substituovaných fenylhydrazínkarboxamidov pripravených v rámci mojej práce – ZR-36, ZR-38, ZR-39, ZR-63 a ZR-51. Porovnaním výsledkov testovania biologickej aktivity proti rovnakým kmeňom mnou pripravených látok so skupinou látok z referencie č. (24) sa ukázalo, že nahradenie metínového mostíka karbonylovým nevedie k zvýšeniu citlivosti mykobaktérií.

Zaujímavosťou bola preukázaná vyššia aktivita látky ZR-34 a ZR-35 proti netuberkulóznym kmeňom. Obe látky sú substituované alkylovým reťazcom, pričom výhodnejším sa zdá byť ako substituent isopropyl v látke ZR-34, ktorá tiež disponuje vyššou lipofilitou (1.87). Táto látka prejavila najvyššiu aktivitu zo všetkých testovaných

látok. Stálo by za to sa zamerať na ďalšiu substitúciu alkylom a tak priniesť možné zvýšenie citlivosti netuberkulózných kmeňov na tomto type látky.

Skupina pripravených *N*-substituovaný fenyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov nepreukázala žiadnu biologickú aktivitu voči testovaným mykobaktériám. Výsledky testovania boli prekvapivé, pretože látky podobného typu uvedené v referencii č. (40) preukázali vyššiu aktivitu v porovnaní s INH. Porovnaním výsledkov vyplýva negatívny dopad zavedenia -NH- skupiny do molekuly.

8. Záver

V tejto diplomovej práci bolo pripravených a charakterizovaných 19 zlúčenín, ktoré možno považovať za pôvodné. Bola pripravená skupina pätnástich derivátov INH spojených karbonylovým mostíkom so substituovaným anilínom, ktorých nasledujúcou cyklizáciou vznikli 4 deriváty 1,3,4-oxadiazol-2-amínu.

V experimentálnej časti boli použité tri metodické postupy s najoptimálnejšími podmienkami reakcie. Biologické testovanie preukázalo najaktívnejšie 2-izonikotinoyl-*N*-substituované fenylylhydrazínkarboxamidy proti jednotlivým kmeňom mykobaktérií, žiadna z nich však neprevýšila aktivitu štandardu INH. Testované kmene mykobaktérií neprejavili žiadnu citlivosť voči celej skupine pripravených *N*-substituovaných fenylyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov. Plánuje sa ešte ďalšie testovanie na enzýmovú aktivitu InhA, poprípade iné.

Niektoré látky preukázali aktivitu proti netuberkulóznym kmeňom. Získané výsledky naznačujú, že predĺženie alkylového reťazca by mohlo viesť k príprave ďalších potenciálne aktívnych antimykobakteriálnych látok.

9. Zoznam použitej literatúry

Zoznam použitej literatúry bol vytvorený pomocou normy ISO 690.

1. **SAKULA, A.** Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus. *Thorax*. 1982. 37: 246-51.
2. TUBERCULOSIS GLOBAL FACTS 2011/2012. URL: http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf [cit. 2013-4-11].
3. Millennium Development Goals (MDGs). URL: http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/en/ [cit. 2013-4-11].
4. **SOLOVIČ, I.** TUBERKULÓZA NA ZAČIATKU 21. STOROČIA - PRAKTICKÝ POHĽAD. *VIA PRACTICA*. 2004. 4: 215-9.
5. **SOLOVIČ, I.** *Tuberkulóza - Vybrané kapitoly*. s.l. : NÚTPCHaHCH Vyšné Hágy, 2008. 978-80-970024-4-2.
6. **LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M.** *Farmakologie a toxikologie*. s.l. : 1. české vyd. Praha: Grada, 2002. 80-247-0836-1.
7. **VIRSÍK, K.** Vývoj boja proti tuberkulóze. Minulosť - súčasnosť a výhľady do budúcnosti. *PRAKTICKÁ GYNEKOLÓGIA*. 1997. 1: 5-7.
8. *Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes*. WHO. Global Tuberculosis Programme. Geneva, 2003.
9. **HAFNER, R., et al.** Early bactericidal activity of isoniazid in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1997. 156: 918-23.
10. **LÓPEZ-MUNOZ, F., et al.** Half a century of antidepressant drugs on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part I: Monoamine oxidase inhibitors. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2007. 6. 0271-0749/07/2706-0555.
11. **SUAREZ, J., et al.** An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *JBC*. 2009. 284: 7017–29.
12. **GUO, H., et al.** Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J. Med. Microbiol*. 2006. 55: 1527–31.
13. **MARRAKCHI, H., LANEELLE, G. a QUEMARD, A.** InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. 2000. 2: 289-96.

14. **LINCOVÁ, D. a FARGHALI, H. et al.** *Základní a aplikovaná farmakologie*. s.l. : 2.. vydání. Praha : Galén, 2007. 978-80-7262-373-0.
15. **DICKINSON, J. M. a MITCHINSON, D. A.** Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981. 123: 367–371.
16. *Treatment of Tuberculosis, American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America*. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR. 2003, 52.
17. **SHARMA, D., et al.** Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. *J. Mol. Biol.* 2007. 4: 1065-76.
18. **YENDAPALLY, R. a LEE, R. E.** Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. 18: 1607-11.
19. **KWOK, A.** Ocular toxicity of ethambutol. *Drug Review.* 2006. 2: 27-9.
20. **VINŠOVÁ, J. a KRÁTKÝ, M.** Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments (Editors: Shui Nguy and Zhou K'ung) (Chapter 2 - Tuberculosis — The Development of New MDR-TB Drugs). *Nova Biomedical*. New York, 2009. 978-1-60876-055-8.
21. **VELAYATI, A. A., et al.** Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. *Eur. Respir. J.* 2009. 34: 1202-3.
22. **KADEŘÁVKOVÁ, Z.** *Syntéza benzoxazolů s potenciální antituberkulotickou aktivitou*. Hradec Králové, 2008. 49 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře anorganické a organické chemie. Vedúci diplomové práce Prof. RNDr. Jarmila Vinšová, Ph.D.
23. **IMRAMOVSKÝ, A., et al.** A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg. Med. Chem.* 2007. 15: 2551-9.
24. **VAVŘÍKOVÁ, E., et al.** New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing substituents. *Eur. J. Med. Chem.* 2011. 46: 5902-9.
25. **RAWAT, J., et al.** Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of isoniazid, p-amino salicylic acid and ethambutol. *ARKIVOC*. 2007. 1424-6376.
26. **JUDGE, V., NARASIMHAN, B. a AHUJA, M.** Isoniazid: the magic molecule. *Med. Chem. Res.* 2012. 21: 3940-57.
27. **SARAIYA, M. F., et al.** Synthesis and antitubercular evaluation of new fluoroquinolone derivatives coupled with carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 2010. 345: 761-7.

28. **MACCARI, R., OTTANA, R. a VIGORITA, M. G.** In vitro advanced antimycobacterial screening of isoniazid-related hydrazones, hydrazides and cyanoboranes: Part 14. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005. 15: 2509-13.
29. **VINŠOVÁ, J., et al.** Recent advance on isoniazid derivates. *Anti-Infective Agents Med. Chem.* 2008. 7: 12-31.
30. **ZHANG, Y., et al.** Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003. 52: 790-5.
31. **DeLOGU, A., et al.** Activity of a new class of isonicotinoylhydrazones used alone and in combination with isoniazid, rifampicin, ethambutol, para-aminosalicylic acid and clofazimine against Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. 49: 275-82.
32. **VAVŘÍKOVÁ, E., et al.** New fluorine-containing hydrazones active against MDR-tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* 2011. 46: 4937-45.
33. **SRIRAM, D., YOGESHWARI, P. a DEVAKARAM, R. V.** Synthesis in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. *Bioorg. Med. Chem.* 2006. 14: 3113-8.
34. **BEDIA, K. K., et al.** Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2006. 41: 1253-61.
35. **SRIRAM, D., YOGESHWARI, P. a PRIYA, D. Y.** Antimycobacterial activity of novel N-(substituted)-2-isonicotinoylhydrazinocarbothioamide endowed with high activity towards isoniazid resistant tuberculosis. *Biomed. Pharmacother.* 2009. 63: 36-9.
36. **LOURENCO, M. C. D. S., et al.** Synthesis and anti-mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstitutedbenzylidene)isonicotinohydrazide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2008. 43: 1344-7.
37. **HEARN, M. a CYNAMON, M.** In vitro and in vivo activities of acylated derivatives of isoniazid against Mycobacterium tuberculosis. *Drug. Des. Discov.* 2003. 18: 103-8.
38. **MOHAMAD, S., IBRAHIM, P. a SADIKUN, A.** Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and its derivative, 1-isonicotinyl-2-nonanoyl hydrazine: investigation at cellular level. *Tuberculosis.* 2004. 84: 56-62.
39. **MAMOLO, M. G., et al.** Antimycobacterial activity of new 3-substituted 5-(pyridin-4-yl)-3H-1,3,4-oxadiazol-2-one and 2-thione derivatives. Preliminary molecular modeling investigations. *Bioorg. Med. Chem.* 2005. 13: 3797-809.

40. **NAVARRETE-VÁZQUEZ, G., et al.** Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* 2007. 15: 5502-8.
41. **JANIN, Y.L.** Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.* 2007. 15: 2479-513.
42. **JURGEC, I.** *Sinteza novih derivatov izoniazida*. Ljubljana, 2005. 43. str. Diplomová práca na Fakulte chémie a chemickej technológie Univerzity v Ljublane na katedre organickej chémie. Vedúci diplomove práce Prof. Dr. Slovenko Polanc.